

MAGDA ELINE GUERRART PORTUGAL

CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA GlnK DE
Streptococcus mutans

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Bioquímica, Curso de Pós – Graduação em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA

2006

Orientadores: Dr^a. Elaine Machado Benelli
Dr. Emanuel Maltempi de Souza

*Ao Deus cuja graça me alcançou
ainda criança e cujo poder, sabedoria e
mistério são minha fonte de inspiração.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, pela vida e por todas as oportunidades que me tem concedido;

ao meu marido Helio Sérgio, pelo amor, incentivo, apoio e compreensão que formaram a base emocional para a realização deste trabalho;

aos meus pais, José Basílio e Denise da Silva Guerrart, por me ensinarem a temer a Deus e pelo exemplo de vida;

ao meu irmão Sâmeque pelas dicas de informática;

aos meus sogros, Ariel e Selma Portugal pelo carinho, preocupação e orações constantes;

ao meu amigo Jorge Vanzuit pelo incentivo ao estudo;

a Prof^a. Dr^a. Elaine Machado Benelli, pela orientação, paciência, incentivo, amizade e pelas maravilhosas aulas de bioquímica que despertaram em mim um fascínio pelo “mundo da bioquímica”;

ao Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza, pelas sugestões, correções e orientação;

ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no Núcleo de Fixação de Nitrogênio com o *Streptococcus mutans*;

à Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Dr^a. Leda Satie Chubatsu pela dedicação dispensada ao curso;

aos demais professores do grupo Dr^a. Liu Un Rigo, Dr. Leonardo Magalhães Cruz, Dr^a. Roseli Wassem, Dr^a. Giseli Klassen, Dr^a. Maria Berenice R. Steffens, Dr^a. Cyntia T. Fadel-Pichet e Dr^a. Rose Adele Monteiro, pelo apoio e sugestões;

ao apoio financeiro da CAPES, CNPq, PRONEX e FUNPAR;

à minha amiga Ana Claudia Bonatto, pela paciência e ajuda nos experimentos;

aos meus amigos de laboratório, Juliana Inaba, Marcelo, Gustavo, André Luis e Rafael, pelas “dicas” e bons momentos de descontração;

aos meus amigos Marianna, Lívia, Rose e André Dedecek, pela amizade e carinho;

ao meu amigo Valter Antônio de Baura pela ajuda nos experimentos de purificação e gel filtração;

às minhas amigas Roseli Prado e Julieta Pie pelo apoio, dedicação e carinho;

à Daniela F. S. Chaves pela ajuda nos experimentos de espectrometria de massa MALDI-TOF;

aos colegas da turma de mestrado Giovani, Helisson, Lys, Adriana, Daniel e Andréia;

aos demais colegas de laboratório, Lílian, Giovana, Luíza, Fabi, Geraldo, Juliana Osaki, Karen e Fernanda;

e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Streptococcus mutans</i>	1
1.1.2 Classificação, Descrição e Morfologia.....	1
1.2 FISILOGIA DO <i>S. mutans</i>	3
1.2.1 Metabolismo de Carboidratos em <i>S. mutans</i>	3
1.2.2 Formação do Biofilme.....	5
1.2.3 Metabolismo do Nitrogênio em <i>S. mutans</i>	9
1.3 ASSIMILAÇÃO DE NUTRIENTES EM PROCARIOTOS.....	12
1.3.1 Assimilação e Metabolismo do Nitrogênio em Bactérias Entéricas.....	13
1.3.2 Assimilação e Metabolismo do Nitrogênio em Diazotrofos Não-Entéricos.....	22
1.3.3 Assimilação e Metabolismo do Nitrogênio em Cianobactérias.....	26
1.3.4 Assimilação de Nitrogênio em Arqueas.....	29
1.3.5 Assimilação de Nitrogênio em Bactérias Gram-Positivas.....	30
2. OBJETIVOS.....	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1 MÉTODOS GERAIS.....	36
3.1.1 Estirpes e Plasmídeos.....	36
3.1.2 Meios de Cultura e Condições de Cultivo.....	36
3.1.3 Manipulação Gênica.....	38
3.1.4 Amplificação do gene <i>glnK</i> de <i>S. mutans</i>	38
3.1.4.1 Clonagem do gene <i>glnK</i> de <i>S. mutans</i> no vetor pGEM-T.....	38
3.1.5 Seqüenciamento de DNA.....	39
3.1.6 Clonagem do gene <i>glnK</i> de <i>S. mutans</i> nos vetores de superexpressão pET29a(+) e pET28b(+)......	39
3.1.7 Clonagem dos genes <i>glnK</i> e <i>glnK-His</i> de <i>S. mutans</i> no vetor pTZ18R.....	40

3.2 FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA.....	40
3.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PROTEÍNA	
GlnK de <i>S. mutans</i>	41
3.3.1 Indução da Expressão das Proteínas GlnK e GlnK-His de <i>S. mutans</i> UA159	
nas estirpes RB9065(λDE3) e BL21 AI de <i>E. coli</i>	41
3.3.2 Purificação da Proteína GlnK de <i>S. mutans</i> UA159.....	42
3.3.3 Purificação da Proteína GlnK-His de <i>S. mutans</i> UA159.....	43
3.3.4 Dosagem de Proteínas.....	44
3.3.5 Eletroforese de Proteínas Sob Condições Desnaturantes (SDS-PAGE).....	44
3.3.6 Eletroforese Nativa em Sistema Descontínuo.....	45
3.3.7 Determinação da Massa Molecular da Proteína GlnK-His	
de <i>S. mutans</i> UA159.....	45
3.3.7.1 Determinação da Massa Molecular da Proteína GlnK-His	
<i>S. mutans</i> UA159 por gel filtração.....	45
3.3.7.2 Determinação da Massa Molecular da Proteína GlnK-His	
<i>S. mutans</i> UA159 por Espectrometria de Massa MALDI-TOF.....	46
3.3.8 Ensaio de Uridililação da Proteína GlnK-His <i>S. mutans</i> UA159.....	46
3.4 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA GlnK DE	
<i>S. mutans</i> UA159 EM <i>E. coli</i>	47
3.4.1 Obtenção dos Transconjugantes para os Ensaio de β-Galactosidase.....	47
3.4.2 Ensaio de β-Galactosidase.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 ANÁLISE AS SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS	
DA PROTEÍNA GlnK DE <i>S. mutans</i>	49
4.2 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE <i>glnK</i> DE <i>S. mutans</i> NOS	
VETORES pGEM-T, pET29a(+) e pET28b(+)......	62
4.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GlnK E GlnK-His-Sm EM <i>E. coli</i>	62
4.4 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnK-Sm E GlnK-His Sm.....	63
4.4.1 Purificação da Proteína GlnK-Sm.....	63
4.4.2 Purificação da Proteína GlnK-His-Sm.....	64
4.4.3 Expressão da proteína GlnK-His-Sm NA ESTIRPE BL21 DE	
<i>E. coli</i> E PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	65
4.5 ENSAIO DE URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnK-His-Sm PELA PROTEÍNA	

GlnD DE <i>E. coli</i>	70
4.6 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA PROTEÍNA GlnK-His-Sm	73
4.7 ESTUDOS <i>IN VIVO</i> DO EFEITO DAS PROTEÍNAS GlnK-Sm E	
GlnK-His-Sm SOBRE O SISTEMA NifL-NifA DE <i>K. pneumoniae</i>	77
4.7.1 Clonagem dos genes <i>glnK</i> e <i>glnK-His</i> de <i>S. mutans</i> no vetor pTZ18R e	
Obtenção dos Transconjugantes para os Ensaio de β -Galactosidase.....	77
4.7.2 Efeito da proteína GlnK-Sm sobre o complexo NifL-NifA de <i>K. pneumoniae</i> ..	77
4.7.3 Efeito da Proteína GlnK-His-Sm Sobre o Complexo NifL-NifA	
de <i>K. pneumoniae</i>	81
5. CONCLUSÕES	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CASCATA REGULADORA DO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM BACTÉRIAS ENTÉRICAS.....	17
FIGURA 2 – REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM DIAZOTROFOS, CIANOBACTÉRIAS, <i>C. glutamicum</i> e <i>B. subtilis</i>	34
FIGURA 3 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DA PROTEÍNA GlnK DE <i>S. mutans</i> E PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII DE DIFERENTES ORGANISMOS.....	54
FIGURA 4 – SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DOS GENES <i>amtB</i> e <i>glnK</i> DE <i>S. mutans</i> COM SUAS PROVÁVEIS REGIÕES REGULADORAS DE TRANSCRIÇÃO.....	55
FIGURA 5 – ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GlnK DE <i>S. mutans</i> COM PROTEÍNAS GlnK DE DIFERENTES ORGANISMOS.....	59
FIGURA 6 – ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GlnK DE <i>S. mutans</i> COM PROTEÍNAS GlnB DE DIFERENTES ORGANISMOS.....	61
FIGURA 7 – PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE ENSAIO DE INDUÇÃO DA PROTEÍNA GlnK DE <i>S. mutans</i> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IPTG E LACTOSE.....	66
FIGURA 8 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES DA PROTEÍNA GlnK DE <i>S. mutans</i> PARCIALMENTE PURIFICADA.....	67
FIGURA 9 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES DA PROTEÍNA GlnK E GlnK-His DE <i>S. mutans</i> PURIFICADAS.....	68
FIGURA 10 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES DA PROTEÍNA	

GlnK-His DE <i>S. mutans</i> PURIFICADA.....	69
FIGURA 11 – ESTRUTURA DO MONÔMERO DAS PROTEÍNAS DO TIPO PII DE <i>E. coli</i> E <i>S. mutans</i>	71
FIGURA 12 – PERFIL DE URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB DE <i>H. seropedicae</i> E GlnK DE <i>S. mutans</i>	72
FIGURA 13 – ANÁLISE ESPÉCTROMÉTRICA DE MASSA DA PROTEÍNA GlnK DE <i>S. mutans</i>	75
FIGURA 14 – DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA PROTEÍNA GlnK-His DE <i>S. mutans</i>	76
FIGURA 15 – EFEITO DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII DE <i>E. coli</i> E <i>S. mutans</i> SOBRE A ATIVAÇÃO DO PROMOTOR <i>nifH</i> DE <i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	83

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESPÉCIES DE <i>S. mutans</i>	2
TABELA 2 – ESTIRPES E PLASMÍDEOS.....	37
TABELA 3 – IDENTIDADE E SIMILARIDADE DA PROTEÍNA GlnK DE <i>S. mutans</i> COM PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII DE DIFERENTES ORGANISMO.....	52
TABELA 4 – EFEITO DAS PROTEÍNAS GlnK E GlnK-His DE <i>S. mutans</i> SOBRE A REGULAÇÃO POR AMÔNIO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO NifL- NifA de <i>K. pneumoniae</i>	84

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	- ângstron
ADP	- adenosina difosfato
Amp	- ampicilina
AMP	- adenosina monofosfato
AMPc	- adenosina monofosfato cíclica
ATase	- enzima adenililtrasferase
ATP	- adenosina trifosfato
Arg	- arginina
pb	- pares de base
Cm	- cloranfenicol
CRP	- proteína de repressão por catabólito
DNA	- ácido dextrorribonucleico
dNTP	- desoxirribonucleosídeo trifosfato
D. O.	- densidade óptica
DRAG	- dinitrogenase redutase glicohidrolase
DRAT	- dinitrogenase ADP-ribosil transferase
DTT	- ditioneitol
e ⁻	- elétron
EDTA	- ácido etilenodiamino-tetra-acético
FAD	- flavina adenina dinucleotídeo
FPLC	- fast permance liquid chromatography
FTF	- frutossiltransferase
g	- grama
GDH	- glutamato desidrogenase
Gln	- glutamina
Gly	- glicina
GOGAT	- glutamato sintase
GS	- glutamina sintetase
HMP	- hexose monofosfato

Ile	- isoleucina
IPTG	- isopropil-tio-galactosídeo
Kb	- quilobase (100 pares de base)
kDa	- quilodáltons
Km	- canamicina
m/v	- massa por volume
NAD ⁺	- nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	- nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NADP ⁺	- fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADPH	- fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
ONPG	- O-nitrofenol- β -D-galactosídeo
PCR	- reação em cadeia da polimerase
PEC	- polissacarídeo extracelular
PEP	- fosfoenolpiruvato
Pi	- fosfato inorgânico
PMSF	- fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPi	- pirofosfato inorgânico
PTS	- fosfotransferase
rpm	- rotações por minuto
SDS	- dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
Ser	- serina
Tc	- tetraciclina
TEMED	- N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamina
Thr	- treonina
TRIS	- tris(hidroximetil)-aminometano

Tyr	- tirosina
U	- unidade enzimática
UMP	- uridilil monofosfato
UTP	- uridilil trifosfato
V	- volts

RESUMO

Streptococcus mutans é uma bactéria gram-positiva que faz parte da flora bucal normal e é considerado o principal agente etiológico da cárie dentária. Nesse organismo, o gene *glnK* foi identificado, porém sua função é desconhecida. O gene *glnK* codifica para uma proteína da família PII que participa da regulação do metabolismo do nitrogênio, carbono e energia em bactérias, eucariotos e arqueas. Para caracterizar a proteína GlnK de *S. mutans*, o gene *glnK* foi amplificado a partir do DNA genômico utilizando oligonucleotídeos sintetizados. O fragmento amplificado foi clonado nos vetores pET29b(+) e pET28b(+), originando os plasmídeos pMEGP2 e pMEGP3, capazes de expressar a proteína GlnK de *S. mutans* na sua forma nativa (GlnK-Sm) e fusionada à uma cauda N-terminal de histidinas (GlnK-His-Sm), respectivamente. A proteína GlnK-Sm foi purificada por cromatografia de troca aniônica (Q-Sepharose) e de afinidade (Hi-Trap Heparin) em um sistema FPLC. A proteína GlnK-His-Sm foi purificada por cromatografia de afinidade na coluna Hi-Trap Chelating-Ni²⁺. A massa molecular aparente da proteína GlnK-His-Sm foi determinada por experimentos de gel filtração, sugerindo que em solução, esta proteína é um homohexâmero. Além disso, a proteína GlnK-His-Sm não foi uridililada pela proteína GlnD de *Escherichia coli*. A atividade das proteínas GlnK-Sm e GlnK-His-Sm foi avaliada nas estirpes YMC10 (selvagem), UNF3435 (*glnB⁻ glnK⁻*) e NCM1686 (*glnD⁻*) de *E. coli* expressando o operon *nifLA* de *Klebsiella pneumoniae* a partir do promotor *lac*. Em *K. pneumoniae*, a proteína NifL inibe a atividade da proteína NifA em altas concentrações de amônio. Sob condições de limitação de nitrogênio, a proteína GlnK desfaz o complexo NifL-NifA e restaura a atividade de NifA. A proteína GlnK-Sm não foi capaz de inibir o efeito repressor de NifL sobre a proteína NifA *K. pneumoniae*. Além disso, a proteína GlnK-Sm aparentemente bloqueia a ação das proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* sobre o complexo NifL-NifA *K. pneumoniae*. Por outro lado, a proteína GlnK-His-Sm é capaz de restaurar parcialmente a atividade da proteína NifA, sob condições limitantes de nitrogênio, de maneira semelhante à proteína GlnK de *E. coli*.

ABSTRACT

Streptococcus mutans is a gram-positive bacterium found in oral cavity, and is considered the leading cause of dental caries. The *glnK* gene was identified in *S. mutans*, but its function has not been elucidated yet. The *glnK* gene codes for a PII-like protein that integrates carbon, nitrogen and energy metabolism in different organisms. To characterize the *S. mutans* GlnK protein, the *glnK* gene was amplified by PCR using synthesized oligonucleotides. The PCR product was cloned into pET29b(+) and pET28b(+) expression vectors. The resulting plasmids were named pMEGP2 and pMEGP3, respectively. The pMEGP2 plasmid expresses the *S. mutans* GlnK protein in its native form (GlnK-Sm) and the pMEGP3 plasmid expresses *S. mutans* GlnK protein with an N-terminal histidine-tag fusion (GlnK-His-Sm). The GlnK-Sm was purified through anionic exchange (Q-Sepharose) and affinity (Hi-Trap Heparin) chromatography. The GlnK-His-Sm protein was purified through a Hi-Trap Chelating-Ni²⁺ column. Gel filtration experiments indicate that the GlnK-His-Sm protein is a homohexamer in solution. Besides that, the GlnK-His-Sm is not uridylylated by the *Escherichia coli* GlnD protein. The activities of the GlnK-Sm and GlnK-His-Sm proteins were assayed in *E. coli* YMC10 (wild type), UNF3435 (*glnB⁻glnK⁻*) and NCM1686 (*glnD⁻*) strains expressing the *Klebsiella pneumoniae* *nifLA* operon from *lac* promoter. In *K. pneumoniae*, NifL inhibits NifA activity under high levels of ammonium but the GlnK protein relieves the inhibition of NifL under low ammonium levels. The GlnK-Sm protein was unable to relieve NifL inhibition of NifA protein under nitrogen fixation conditions. Furthermore, the GlnK-Sm protein blocked the effect of the *E. coli* GlnB and GlnK proteins on the NifL-NifA complex. Surprisingly, the GlnK-His-Sm protein was able to relieve NifL inhibition of the NifA protein under nitrogen limitation conditions, in a manner similar to the *E. coli* GlnK protein.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus mutans*

1.1.2 Classificação, Descrição e Morfologia

Streptococcus mutans é um organismo procariótico pertencente ao reino Bactéria, filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Streptococcaceae, gênero *Streptococcus* e espécie *S. mutans*. Os estreptococos são cocos que se agrupam em pares, ou em colônias lineares quando crescidos em meio líquido. Suas células são esféricas ou ovóides, de 0,5 a 2,0 µm de diâmetro, e não possuem órgãos de locomoção como cílios e flagelos. Os estreptococos são gram-positivos e não formam esporos. A grande maioria desses organismos é saprófita, mas alguns são patogênicos (HOLT, 1994). Os estreptococos são catalase-negativos e o produto final do metabolismo fermentativo é principalmente o lactato (HOLT, 1994). A maioria dos estreptococos é anaeróbia facultativa, embora alguns sejam anaeróbios estritos. Estes microrganismos normalmente requerem um meio de cultura rico em nutrientes para crescer e a temperatura ótima de crescimento é 37 °C.

Os estreptococos orais, são classificados em quatro grupos: anginosus, mitis, mutans e salivarius (FOX, 1999). De acordo com as características bioquímicas e genéticas, as estirpes de estreptococos do grupo mutans podem ser divididas em 7 espécies distintas: *S. mutans*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus macacae* e *Streptococcus ferus*. Destas espécies, as mais freqüentemente isoladas em humanos são os *S. mutans* e *S. sobrinus* (Tabela 1) (COYKENDALL, 1977; COYKENDALL, 1989; WHILEY & BEIGHTON, 1998).

Tabela 1 - Espécies de *S. mutans*

Espécie	% G+C	Sorotipo	Principal polissacarídeo da parede celular	Hospedeiro
<i>S. mutans</i>	36-38	<i>c, e, f</i>	Rha, Glc	Homem
<i>S. rattus</i>	41-43	<i>b</i>	Rha, Gal, Gro	Homem
<i>S. sobrinus</i>	44-46	<i>d,g</i>	Rha, Glc, Gal	Homem, animais
<i>S. cricetus</i>	42-44	<i>a</i>	Rha, Glc, Gal	Ratos
<i>S. downei</i>	41-42	<i>h</i>	ND	Homem, Roedores
<i>S. macacae</i>	35-36	<i>c</i>	ND	Macacos
<i>S. ferus</i>	43-45	<i>c</i>	Rha, Glc	Macacos

FONTE: MAIDEN *et al.*, 1992; WHILEY & BEIGHTON, 1998.

NOTA: Abreviações: Rha, rhamnose; Glc, glucose; Gal, galactose; Gro, glicerol; ND, não determinado.

S. mutans é uma bactéria que compõem a microbiota da cavidade bucal e o principal agente etiológico da cárie dental. Este organismo foi identificado pela primeira vez em lesões cariosas profundas como cocobacilos cuja morfologia era mais oval que esférica (CLARK, 1924). Assim, Clarke (1924) denominou estes organismos de *S. mutans* por pensar que fossem mutantes de outros estreptococos. A forma oval de algumas dessas células foi novamente descrita muitos anos depois por COYKENDALL (1971). O fator responsável pela mudança morfológica nesses organismos é a proporção $\text{HCO}_3^-/\text{K}^+$ no meio de cultura. Quando essa proporção é baixa, as células são ovais e quando a proporção é alta, as células são esféricas (TAO *et al.*, 1987).

O habitat primário do *S. mutans* é a superfície dental humana e, após ter colonizado a dentição, pode também ser encontrado na saliva, na língua, nas membranas mucosas e na superfície de dentaduras e aparelhos ortodônticos (ALALUUSUA *et al.*, 1994). Este organismo é capaz de causar inflamações oculares em neonatos e endocardite (PARKER & BALL, 1976; REEDER *et al.*, 1985).

1.2 FISILOGIA DO *S. mutans*

1.2.1 Metabolismo de Carboidratos em *S. mutans*

S. mutans é o agente etiológico primário da cárie dental. Este microrganismo desenvolveu uma série de mecanismos para colonização da superfície dental, que tornam a espécie significativamente mais numerosa no biofilme cariogênico (BURNE, 1988). Além disso, este organismo é capaz de utilizar uma grande variedade de carboidratos fermentáveis em concentrações micromolares para crescer e sobreviver em baixo pH, apresentando genes para o transporte e metabolismo da glucose, frutose, sacarose, lactose, galactose, manose, celobiose, β -glucosídeos, trealose, maltose/maltodextrina, rafinose, ribulose, melibiose, amido, isomaltossacarídeos e possivelmente sorbose (AJDIC, *et al.*, 2002; WEN & BURNE, 2002).

O metabolismo bacteriano resulta na produção de ácidos que contribuem para acidificação da placa dental. Quando o pH é inferior a 5,5, ocorre a dissociação dos cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) do esmalte. O desenvolvimento da cárie

é um processo prolongado que envolve ciclos de des- e re-mineralização do esmalte. Os períodos de acidificação da placa são seguidos por períodos de alcalinização, nos quais o pH volta ao neutro. Quando os períodos de des-mineralização predominam, ocorre a cárie dental (STEPHAN, 1940; THEUNS, *et al.*, 1984).

A maior parte dos sistemas de transporte de moléculas e íons identificados em *S. mutans* são ATP-dependentes, uma característica também observada em outros organismos que não possuem uma cadeia transportadora de elétrons (RAWN, 1989; ALBERTS *et al.*, 1994; AJDIC, *et al.*, 2002). Em *S. mutans*, três tipos de ATPases estão presentes: as do tipo P, as do tipo F e as do tipo ABC. Acredita-se que as ATPases do tipo P sejam responsáveis pelo transporte de Ca^{2+} e K^{+} , e pela resistência bacteriana aos metais Cu^{2+} e Cd^{2+} , que são tóxicos à célula. As ATPases do tipo F (F_0F_1 -ATPases) utilizam um gradiente eletroquímico de H^{+} ou Na^{+} para sintetizar ATP, ou hidrolisam ATP para reverter um gradiente eletroquímico (SAIER *et al.*, 1993). Já as ATPases do tipo ABC são as mais abundantes, com mais de 60 transportadores do tipo ABC no genoma do *S. mutans*, que são responsáveis por aproximadamente 10% das ORFs (Open Reading Frames) do genoma deste organismo (AJDIC, *et al.*, 2002).

Os sistemas das permeases e da fosfotransferase (PTS) são os sistemas de transporte de carboidratos melhor caracterizados em *S. mutans*. As permeases utilizam um mecanismo de difusão facilitada, ativo em concentrações de carboidratos superiores a 100 $\mu\text{mol/L}$, que opera até que as concentrações intracelulares de carboidratos igualem-se às extracelulares. Portanto, é um sistema inoperante nas concentrações normais de glucose na saliva, que variam entre 5 e 40 $\mu\text{mol/L}$. A maior parte dos carboidratos é transportada pelo sistema PTS, que utiliza um mecanismo de translocação de grupo no qual o fosfoenolpiruvato (PEP) é a fonte de energia, e resulta na fosforilação e transporte do carboidrato para dentro da célula. O sistema PTS é formado pelo acoplamento de dois componentes: a enzima I e uma proteína termoestável (HPr), e muitas permeases conhecidas como enzima II (HANSON & ANDERSON, 1968; AJDIC, *et al.*, 2002). *S. mutans* também possui proteínas exportadoras de carboidratos, que provavelmente transportam os intermediários do metabolismo para o meio extracelular (RUSSELL, *et al.*, 1992; AJDIC, *et al.*, 2002).

A sacarose da dieta é essencial para o acúmulo de *S. mutans* na superfície dental e conseqüente início das lesões cariosas (ROLLA, 1989). Uma vez dentro da célula, este carboidrato é metabolizado pelas enzimas da via glicolítica (via Embden-Meyerhof), produzindo piruvato. Este é então reduzido a vários produtos de fermentação tais como ácido láctico, etanol e acetato (ABBE *et al.*, 1991; AJDIC, *et al.*, 2002). Dentre esses, o ácido láctico é aquele produzido em maior quantidade por células cultivadas sob condições limitantes de nitrogênio mas com excesso de glucose. WHITE *et al.* (1976) examinaram os efeitos da limitação nutricional na produção de ácido láctico por *S. mutans* e os resultados obtidos demonstraram que os maiores índices na produção deste metabólito ocorrem sob condições limitantes de fosfato e nitrogênio quando comparados com condições limitantes de glucose.

Em muitas bactérias, a via glicolítica tem como principal função fornecer energia na forma de ATP, enquanto a via das hexoses monofosfato (HMP) disponibiliza pentoses para a produção de ácidos nucléicos e NADPH para a biossíntese dos componentes celulares (GOTTSCALK, 1986). Entretanto, como *S. mutans* não possui as enzimas glucose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, da porção oxidativa da via das hexoses, a formação de NADPH se deve à ação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, presente neste organismo (BROWN & WITTENBERGER, 1971a, BROWN & WITTENBERGER, 1971b; YAMADA & CARLSSON, 1973).

1.2.2 Formação do Biofilme

Biofilme é um denso agregado microbiano embebido numa matriz de polissacarídeos extracelulares (PEC) resultante da aderência, multiplicação e desenvolvimento de microrganismos sobre superfícies sólidas, em presença de substrato, em ambiente líquido (CVITKOVITCH *et al.*, 2003). Estudos de genética molecular revelaram que a formação do biofilme é um processo complexo e dinâmico, envolvendo sistemas de sinalização múltiplos e convergentes (PARSEK & GREENBERG, 2000). O padrão geral de formação do biofilme inclui a adesão inicial de células a uma superfície sólida, a multiplicação das células aderidas, formação de microcolônias, produção de uma matriz de PEC e finalmente, a diferenciação em um biofilme tridimensional (LI & BOWDEN, 1994; O'TOOLE *et al.*, 2000). Alguns

biofilmes maduros são caracterizados pela formação de estruturas em forma de cogumelos ou torres, com canais internos de água que permitem a entrada de nutrientes e a saída de produtos finais do metabolismo (LAWRENCE *et al.*, 1991; COSTERTON *et al.*, 1995).

A cavidade bucal é constantemente banhada pela saliva, que mantém a temperatura entre 35-36 °C e o pH entre 6,75 e 7,25, condições ótimas para o desenvolvimento de muitas bactérias (SCANNAPIECO, 1994; EDGAR & O'MULLANE, 1996). Portanto, a saliva tem uma grande influência na composição da microbiota bucal, pois os componentes orgânicos nela presentes, como a uréia, amônio, proteínas e carboidratos, influenciam o estabelecimento e seleção da microflora bucal, promovendo a adesão de certos organismos, agregando outras espécies e ao mesmo tempo, facilitando a remoção desses organismos pela deglutição (SCANNAPIECO, 1994; EDGAR & O'MULLANE, 1996). Os componentes orgânicos da saliva, juntamente com os íons Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} e PO_4^- atuam como fonte de nutrientes para as bactérias orais. Entretanto, a concentração de nutrientes prontamente disponíveis nas secreções salivares é muito baixa, gerando competição entre os diferentes microrganismos bucais para obtê-los (SCANNAPIECO, 1994; EDGAR & O'MULLANE, 1996; FEJERSKOV & THYLSTRUP, 2001).

A formação do biofilme dental é uma estratégia utilizada pelos microrganismos para otimizar a sua sobrevivência na cavidade bucal. A formação do biofilme é dependente das interações dos microrganismos entre si e com a superfície dental (BOWDEN *et al.*, 1975; DAWES, 1989). As bactérias da cavidade bucal nunca entram em contato com uma superfície dental limpa. Imediatamente após a limpeza da superfície dental, moléculas derivadas principalmente da saliva, glicoproteínas ricas em prolina, fosfoproteínas e lipídeos, são adsorvidas ao esmalte ou cemento dentais (BUSSCHER & VAN DER MEI, 2000). Além disso, produtos oriundos das superfícies celulares bacterianas, do metabolismo bacteriano, ácido siálico e polímeros do fluido gengival do hospedeiro também são adsorvidos (GIBBONS & van HOUTE, 1980; SCANNAPICCO *et al.*, 1989; GIBBONS *et al.*, 1991; DUAN *et al.*, 1994; SCANNAPICCO *et al.*, 1995). Uma camada acelular com aproximadamente 10 μm de espessura, denominada de película adquirida, resulta da adsorção daquelas moléculas (MARSH, 1999; FEJERSKOV & THYLSTRUP, 2001). As moléculas da película adquirida, em contato com a hidroxiapatita do

esmalte, sofrem alterações conformacionais, expondo sítios para a ligação dos colonizadores primários *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus parasanguis*, os quais constituem de 60 a 80% da população bacteriana inicial (NYVAD & KIIAN, 1987; OPHIR & GUTNICK, 1994). As bactérias gram-negativas, como *Actinomyces* sp., correspondem à menor proporção da microbiota inicial (FEJERSKOV & THYLSTRUP, 2001).

S. gordonii adere-se à película adquirida através de interações específicas com o ácido siálico ou através de interações com a α -amilase salivar (COWAN *et al.*, 1987; SCANNAPIECO *et al.*, 1995). *Actinomyces viscosus* adere-se às proteínas salivares ricas em prolina (GIBBONS & RAY, 1988). Neste período inicial da colonização dos dentes, a película e os microrganismos são facilmente removidos, pois predominam as forças de Van der Waals e de repulsão eletrostática (BUSSCHER & VAN DER MEI, 1997).

Os colonizadores primários começam a multiplicar-se e modificam as condições ambientais locais, sintetizando PEC e proteínas que promovem a consolidação da matriz do biofilme e que permite a colonização por microrganismos que não têm estruturas de aderência, os chamados colonizadores secundários (WHITTAKER *et al.*, 1996; JENKINSON & LAMONT, 1997; LAMONT & JENKINSON, 2000). A microbiota inicial produz frutanas e glucanas a partir da sacarose. As glucanas extracelulares são produzidas através do sistema glucosiltransferase (GTF) em *S. gordonii*, e participam na formação da matriz do biofilme (SUTHERLAND, 1999). As frutanas são produzidas pelo sistema frutossiltransferase (FTF) em *S. gordonii* e *A. viscosus* e são os principais carboidratos de reserva para estes e outros microrganismos bucais (BURNE, 1991). Embora os *S. mutans* possam elaborar polissacarídeos extracelulares adesivos a partir da sacarose, eles constituem apenas 2% ou menos da microbiota inicial de estreptococos no biofilme (RUSSELL *et al.*, 1985; FEJERSKOV & THYLSTRUP, 2001).

O biofilme ecológico desenvolve-se de forma equilibrada e estratificada. A medida que os depósitos bacterianos tornam-se mais espessos, há uma diminuição na tensão de oxigênio, o que proporciona uma troca progressiva de espécies principalmente aeróbias e de algumas espécies anaeróbias facultativas nos primeiros estágios, para uma situação em que as espécies anaeróbias facultativas e

anaeróbias predominem (MARSH, 1999; FEJERSKOV & THYLSTRUP, 2001). Os colonizadores secundários aderem-se às espécies já existentes no biofilme por sistemas receptor-adesinas, um processo denominado de co-adesão (KOLENBRANDER & LONDON, 1993; BOS *et al.*, 1994; KOLENBRANDER, 1998; KOLENBRANDER *et al.*, 2000).

Uma vez estabelecido na superfície dentária, o biofilme mantém sua composição microbiana relativamente constante, apesar da exposição dos organismos a uma variedade de perturbações ambientais, tais como: ingestão de alimentos e bebidas, mudanças hormonais, higiene bucal, medicamentos, entre outras. A adaptação microbiana ao ambiente bucal resulta de um balanço nas tensões dinâmicas que surgem das interações sinérgicas e antagônicas entre os diferentes organismos (MARSH, 1994; MARSH, 1995). Todavia, o equilíbrio microrganismo/hospedeiro pode ser quebrado por deficiência e/ou disfunção das defesas do hospedeiro ou por uma mudança nas condições ambientais.

No caso da cárie, mudanças nas condições ambientais, como redução do fluxo salivar ou, mais freqüentemente, aumento do consumo de substratos fermentáveis, resultam na diminuição do pH da placa dentária (MARSH, 1999). Assim, microrganismos acidúricos (que sobrevivem em baixo pH) são selecionados e é formado o biofilme cariogênico (van HOUTE, 1980). Neste caso, há uma prevalência dos estreptococos do grupo mutans, principalmente *S. mutans* e outros microrganismos acidúricos como os lactobacilos e leveduras. Estes organismos produzem ácidos e o pH da placa dental é reduzido até o pH crítico de 5,5, o que promove a solubilização dos cristais de hidroxiapatita que compõem o esmalte dental (FEJERSKOV & THYLSTRUP, 2001). Se o pH se mantiver acima de 5,5 por um período de tempo significativo, a remineralização do esmalte poderá reverter o dano inicial, mas a uma velocidade muito inferior àquela da desmineralização (MOBLEY, 2003).

Dentre as características patogênicas do *S. mutans*, a mais importante é a sua capacidade de adesão à superfície dental mediada pela metabolização da sacarose (HAMADA *et al.*, 1984). Este organismo sintetiza glucanas solúveis e/ou insolúveis a partir da sacarose pela atividade de três enzimas GTF (GTFB, GTFC e GTFD) (RUSSELL *et al.*, 1985; OOSHIMA *et al.*, 2001). As glucanas participam ativamente na adesão do *S. mutans* ao esmalte (OOSHIMA *et al.*, 2001).

Juntamente com as glucanas, *S. mutans* também sintetiza as proteínas que se ligam as glucanas, GbpA, GbpB e GbpC que são codificadas pelos genes *gbpA*, *gbpB* e *gbpC*, respectivamente (RUSSEL *et al.*, 1985; BANAS *et al.*, 1990; SMITH *et al.*, 1994; SATO *et al.*, 1997; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001). *S. mutans* também é capaz de sintetizar, a partir da sacarose, frutanas extracelulares que contribuem para a formação do biofilme cariogênico. Estirpes de *S. mutans* incapazes de sintetizar frutossiltransferase são menos cariogênicas (MUNRO *et al.*, 1991).

A habilidade de sintetizar polímeros de frutose nos biofilmes bucais permite que os organismos capturem uma grande proporção de sacarose da dieta, formando um polissacarídeo de reserva não-difusível, que pode ser metabolizado quando as fontes exógenas são escassas (HIGUSHI *et al.*, 1970; GOLD *et al.*, 1974; BURNE, 1991). Os polímeros da frutose, levana e inulina, assim como a sacarose e rafinose, são substratos para o produto do gene *fruA* de *S. mutans* (BIRKHED *et al.*, 1979). Este gene codifica para uma hidrolase extracelular, FruA, que libera frutose dos polímeros de levana, inulina e da rafinose, além de quebrar a sacarose em glucose e frutose (BURNE *et al.*, 1987).

A acidificação do ambiente bucal pelos produtos do metabolismo fermentativo dos carboidratos inibe muitas bactérias competidoras e possibilita ao *S. mutans* manter o seu nicho e conseqüentemente causar a lesão cariosa. Essa capacidade de tolerar ambientes ácidos é conseqüência da presença de um sistema F_0F_1 -ATPase translocador de prótons ligado à membrana, que é estável em meio ácido e mantém o gradiente transmembrana (QUIVEY *et al.*, 2001). Esse sistema lança prótons para fora da célula e não sintetiza ATP pelo influxo dos mesmos, fato que, juntamente com a inexistência dos genes que codificam para a cadeia transportadora de elétrons, impede os streptococos de realizar a respiração aeróbia (RAWN, 1989; ALBERTS *et al.*, 1994). Também é possível que a descarboxilação de aminoácidos e peptídeos possa ajudar *S. mutans* a tolerar ambientes ácidos pela geração de dióxido de carbono intracelular (MALONEY, 1994).

1.2.3 Metabolismo do Nitrogênio em *S. mutans*

A disponibilidade, transporte e biossíntese de aminoácidos por *S. mutans* poderiam agir como fatores limitantes para o crescimento bacteriano. Além disso, a

produção de proteínas associadas à virulência, como glucosiltransferases e ATPases translocadoras de prótons, pode ser limitada dependendo das condições de crescimento do organismo (DASHPER *et al.*, 1995).

S. mutans é capaz de crescer anaerobicamente em ausência de aminoácidos usando amônio como única fonte de nitrogênio (MARTIN & WITTENBERGER, 1980; CVITKOVITCH *et al.*, 1997). Neste organismo, a assimilação de amônio ocorre via glutamato desidrogenase (GDH), ou via glutamina sintetase (GS)/glutamato sintase (GOGAT), semelhante ao observado em outros organismos (GRIFFITH & CARLSSON, 1974; MARTIN & WITTENBERGER, 1980).

Quando aminoácidos e peptídeos são adicionados ao meio de cultura, *S. mutans* é capaz de crescer rapidamente (TERLECKYJ *et al.*, 1975), pois apresenta sistemas de transporte para alguns aminoácidos e peptídeos (DASHPER *et al.*, 1995). *S. mutans* apresenta um sistema de transporte para aminoácidos ramificados dependente de força próton-motriz (DASHPER & REYNOLDS, 1993).

A glutamina pode ser utilizada por algumas bactérias como única fonte de nitrogênio, sendo captada pela célula e convertida em glutamato e amônio pela ação da enzima glutaminase (NEIDHARDT *et al.*, 1990). O amônio liberado nesta reação pode ser utilizado na síntese *de novo* de aminoácidos, purinas e pirimidinas (DASHPER *et al.*, 1995). Em *S. mutans*, além das enzimas envolvidas na síntese de glutamina, existem cinco prováveis transportadores do tipo ABC para este aminoácido, enfatizando a importância da glutamina como principal fonte de nitrogênio e substrato para a biossíntese de outros aminoácidos (AJDIC *et al.*, 2002). CIVITKOVITCH *et al.* (1999) sugerem que tais sistemas possam também estar envolvidos no transporte de oligopeptídeos provenientes da degradação proteica, embora algumas estirpes de *S. mutans* não possam utilizar oligopeptídeos como única fonte de nitrogênio (ADERSSON, *et al.*, 1984).

S. mutans possui um sistema de transporte de glutamina único, específico e ATP-dependente (DASHPER *et al.*, 1995). O fato do transporte de Gln ser dependente de ATP pode ser um importante fator na ecologia do *S. mutans*, já que em condições limitantes de energia, a glutamina não escaparia facilmente da célula como aconteceria com um substrato de um sistema de transporte movido pela força próton-motriz (DASHPER *et al.*, 1995).

Glutamato e aspartato são assimilados através de um sistema de transporte primário dependente de ATP entre pH 5,5 e 8,5 (NOJI *et al.*, 1988). A presença de íons K^+ é indispensável para o transporte de glutamato em *S. mutans*. Os mecanismos propostos para explicar o estímulo do transporte de glutamato por íons K^+ são:

- a) o movimento dos íons K^+ contribuiria para ajustar o pH intracelular;
- b) cancelamento do potencial de membrana proveniente do movimento de moléculas de glutamato carregadas negativamente (SATO *et al.*, 1989).

A biossíntese do glutamato em *S. mutans* pode ser essencial para a sua sobrevivência nas condições existentes na placa dental (CVITKOVITCH *et al.*, 1997). Nas camadas mais profundas da placa dental, onde os aminoácidos livres são limitantes, a biossíntese do glutamato ocorre em condições anaeróbicas. Nestas camadas, compostos nitrogenados simples como amônio, produzido pela hidrólise da uréia salivar por outros microrganismos, são, possivelmente, a única fonte de nitrogênio disponível para *S. mutans* (CVITKOVITCH *et al.*, 1997).

Em anaerobiose, *S. mutans* produz acetil-CoA através da enzima piruvato formato liase. O oxaloacetato é produzido pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (YAMADA & CARLSSON, 1973; ABBE *et al.*, 1982). CVITKOVITCH *et al.* (1997) mostraram que *S. mutans* apresenta as enzimas citrato sintase, aconitase e isocitrato desidrogenase, que são necessárias para converter acetil-CoA e oxaloacetato em 2-oxoglutarato, precursor da síntese do glutamato.

A capacidade do *S. mutans* em regular o transporte e metabolismo de seus nutrientes essenciais confere ao mesmo grande flexibilidade bioquímica, permitindo-o sobreviver em condições de fartura ou escassez no meio bucal (CVITKOVITCH *et al.*, 1997). Embora o metabolismo de compostos nitrogenados esteja interligado ao metabolismo de carboidratos e, possivelmente, à fixação do dióxido de carbono em *S. mutans*, pouco se conhece a respeito do controle do metabolismo nitrogenado em nesse organismo. Como este trabalho visa contribuir nesta área, revisaremos a seguir o controle do metabolismo nitrogenado em procariotos.

1.3 ASSIMILAÇÃO DE NUTRIENTES EM PROCARIOTOS

Organismos procariotos são encontrados nos mais variados habitats no globo terrestre e são expostos a constantes variações nutricionais impostas por tais ambientes. Dentro de certos limites, os procariotos podem responder às mudanças do ambiente alterando a síntese e atividade de proteínas estruturais, proteínas transportadoras e enzimas. As bactérias, de um modo geral, desenvolveram mecanismos sofisticados e diversificados para regular as vias anabólicas e catabólicas, maximizando as taxas de crescimento sob determinadas condições ambientais, e evitando o desperdício de nutrientes e energia. Em bactérias, as enzimas degradativas não são produzidas ou não estão ativas a menos que o seu substrato esteja presente no meio. Da mesma forma, vias biossintéticas não são expressas ou são interrompidas quando os produtos finais das mesmas não são necessários ou são prontamente obtidos do meio (GOTTSCALK, 1986).

Apesar da enorme versatilidade individual exibida por esses microrganismos, alguns mecanismos de regulação e integração do metabolismo são extremamente conservados, como é o caso das proteínas da família PII que atuam no controle do metabolismo do nitrogênio, do carbono e energético em diversos organismos incluindo eucariotos, bactérias e archaea (NINFA & ATKINSON, 2000; ARCONDÉGUY *et al.*, 2001).

A família de proteínas do tipo PII tem como principal representante a proteína GlnB, uma proteína transdutora de sinal envolvida na regulação da atividade das proteínas relacionadas com a utilização de fonte alternativas de nitrogênio (NINFA & ATKINSON, 2000). Em bactérias e archaea, as proteínas do tipo PII atuam como unidades centrais, processando os sinais antagônicos dos níveis de nitrogênio e carbono na célula, sinalizados pelas moléculas de glutamina e 2-oxoglutarato, respectivamente (NINFA & ATKINSON, 2000). Proteínas parálogas à proteína GlnB como a proteína GlnK, foram identificadas em diversos organismos (SANDERS *et al.*, 1989; HARRISON *et al.*, 1990; ATKINSON & FISHER, 1991; TSINOREMAS *et al.*, 1991; BENELLI, *et al.*, 1997; EHLERS *et al.*, 2005). Embora as proteínas GlnB e GlnK apresentem alta identidade em sequência e alta similaridade estrutural, elas exercem diferentes funções no controle do metabolismo do nitrogênio (van HEESWIJK *et al.*, 1996; THOMAS *et al.*, 2000; COUTTS *et al.*, 2002).

A fisiologia e regulação do metabolismo do nitrogênio é melhor descrita em organismos gram-negativos entéricos e diazotrofos, nos quais o sistema NTR controla a assimilação de fontes alternativas de nitrogênio. Outros organismos gram-negativos como as cianobactérias e organismos gram-positivos não apresentam um sistema de regulação global semelhante ao NTR, possuindo mecanismos diversificados para regular a assimilação de nitrogênio. A seguir serão descritos os principais aspectos da assimilação e metabolismo de nitrogênio em diferentes organismos.

1.3.1 Assimilação e Metabolismo do Nitrogênio em Bactérias Entéricas

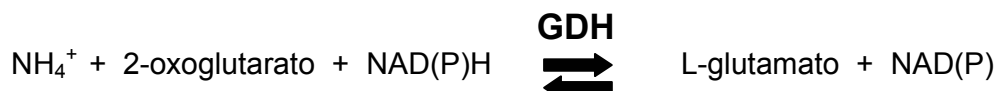
De um modo geral, a assimilação de nitrogênio por bactérias entéricas ocorre em consequência do processamento de sinais antagônicos dos níveis de nitrogênio, carbono e energia pela proteína GlnB (NINFA & ATKINSON, 2000). Nestes organismos, a proteína GlnB interage com outras proteínas e enzimas que controlam o metabolismo do nitrogênio, monitorando os níveis de amônio e glutamina disponíveis nas células (NINFA & ATKINSON, 2000).

As bactérias entéricas utilizam o amônio como principal fonte de nitrogênio. Além de não requerer grande gasto energético para ser processado, o amônio é rapidamente assimilado em glutamato e glutamina, que são os principais doadores de grupamentos amino para as reações biossintéticas. (REITZER, 1996a; REITZER, 1996b). Por outro lado, quando o meio fornece fontes orgânicas de nitrogênio como aminoácidos, estes serão primeiramente degradados em amônio. Fontes inorgânicas de nitrogênio como nitrato, nitrito e nitrogênio molecular devem ser reduzidas antes da assimilação (REITZER, 1996a; REITZER, 1996b).

A maioria das bactérias apresenta duas vias principais para assimilação do amônio. A primeira via é denominada de via glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT) que catalisa as seguintes reações:



A segunda via de assimilação do amônio é a via glutamato desidrogenase (GDH) que catalisa a seguinte reação:



Como o K_m para o amônio da enzima GDH é alto (de 0,3 – 1,2 mmol/L), esta enzima é responsável pela assimilação do amônio quando este encontra-se em altas concentrações no meio extracelular (WOOTTON, 1983; WOOTTON & Mc PHERSON, 1984). Por outro lado, como a enzima GS possui baixo K_m (0,01 - 0,15 mmol/L) para o amônio, esta enzima é responsável pela assimilação de nitrogênio quando este encontra-se em baixas concentrações no meio extracelular (WOOTTON & Mc PHERSON, 1984; REITZER, 1996a; REITZER, 1996b). Como a enzima GS participa da principal via de assimilação de amônio, a sua expressão é altamente regulada e a sua atividade é controlada por modificações pós-traducionais, consequências da transdução de sinais através de um grupo de proteínas que formam um sistema global de regulação denominado sistema NTR (RHEE *et al.*, 1989; MAGASANIK, 1993; MERRICK & EDWARDS, 1995; REITZER, 1996a; REITZER, 1996b). A atividade da enzima GS também está sujeita à inibição por retroalimentação negativa por vários compostos nitrogenados como alanina, serina, glicina, histidina, triptofano, carbamil fosfato, glicosamina-6-fosfato, AMP e CTP. A

inibição completa requer a presença de todos os inibidores e estudos estruturais sugerem que o AMP liga-se ao sítio de ligação do ATP; os aminoácidos glicina, alanina e serina ligam-se ao sítio de ligação do glutamato e que o carbamil fosfato sobreponha-se aos sítios de ligação do glutamato e do fosfato. A ligação do carbamil fosfato impede a ligação dos aminoácidos alanina, serina e glicina (DAHLQUIST & PURICH, 1975; YAMASHITA *et al.*, 1989; LIAW *et al.*, 1993).

Em enterobactérias, as proteínas GlnB e sua paróloga GlnK, produtos dos genes *glnB* e *glnK*, respectivamente, interagem com as proteínas, NtrB, GlnD e GlnE, controlando a atividade do sistema NTR (NINFA & ATKINSON, 2000). Esse sistema é formado por um conjunto de genes responsáveis pela assimilação de fontes alternativas de nitrogênio. A expressão desses genes é regulada pela disponibilidade de nitrogênio na célula (NINFA *et al.*, 1995).

A proteína NtrB é uma histidina quinase que regula a atividade da proteína NtrC por fosforilação. A proteína NtrC é um ativador transcricional de promotores dependentes do fator σ^{54} da RNA polimerase, requerido para ativar a transcrição de operons que codificam para as proteínas responsáveis pela utilização de fontes alternativas de nitrogênio (KUSTU *et al.*, 1989; MORETT & SEGOVIA, 1993). Os genes que codificam para as proteínas GS, NtrB e NtrC fazem parte de um único operon, *glnAntrBC*, em *E. coli* (PAHEL *et al.*, 1982). A atividade da proteína GS é controlada pela proteína GlnE que adenilila reversivelmente esta proteína. As atividades das proteínas GlnE e NtrB são controladas pelas proteínas GlnB e/ou GlnK, que têm suas atividades controladas por modificação covalente e pela ligação de moléculas moduladoras (ENGLEMAN & FRANCIS, 1978; RHEE *et al.*, 1985; KAMBEROV *et al.*, 1995; LIU & MAGASANIK, 1995; JIANG *et al.*, 1998b).

A proteína GlnD é uma enzima sensora-reguladora que responde às concentrações intracelulares de glutamina (ATKINSON & NINFA, 1998; JIANG *et al.*, 1998a). De acordo com os níveis de glutamina, a proteína GlnD transfere ou remove grupamentos UMP (uridililação/desuridililação) da proteína GlnB exercendo assim um papel fundamental na regulação do metabolismo do nitrogênio (SON & RHEE, 1987; ATKINSON & NINFA 1999). Além da modificação covalente, a atividade da proteína GlnB é controlada pela ligação de ATP e 2-oxoglutarato. Estas moléculas são necessárias para a reação de uridililação de GlnB e modulam a interação desta

proteína com as proteínas GlnE e NtrB (JIANG *et al.*, 1998a; JIANG *et al.*, 1998b; JIANG *et al.*, 1998c).

Em *Escherichia coli*, quando os níveis de amônio estão baixos a relação glutamina/2-oxoglutarato também é baixa e a proteína GlnD apresenta atividade de uridililtransferase e uridilila a proteína GlnB no resíduo Tyr51 (Figura 1) (SON & RHEE, 1987). GlnB-UMP não interage com a proteína NtrB, que na forma livre tem atividade de quinase e catalisa sua autofosforilação no resíduo His139 (WEISS & MAGASANIK, 1988). Este grupamento fosforil é transferido para o resíduo Asp54 do domínio N-terminal da proteína NtrC (SANDERS *et al.*, 1992; KLOSE *et al.*, 1993). Na forma fosforilada (NtrC-P), NtrC ativa a transcrição de genes envolvidos com o metabolismo de fontes alternativas de nitrogênio, entre eles o operon *glnAntrBC* de *E. coli* e o operon *nifLA* de *Klebsiella pneumoniae*, envolvido na fixação de nitrogênio (MERRICK & EDWARDS, 1995).

Na presença de GlnB-UMP e glutamina, o domínio N-terminal da proteína GlnE tem atividade de enzima removedora de adenilil e catalisa a desadenililação de GS, numa reação que requer ATP e 2-oxoglutarato (STADTMAN *et al.*, 1970; RHEE *et al.*, 1985; JAGGI *et al.*, 1997). Assim, GS está ativa e pode catalisar a reação de conversão de amônio e glutamato em glutamina. Quando os níveis de amônio intracelular aumentam, a glutamina parece ligar-se à GlnD e sob tais condições, GlnD desuridilila GlnB (ATKINSON *et al.*, 1994; KAMBEROV *et al.*, 1994; NINFA *et al.*, 1995; JIANG *et al.*, 1998b). O estado de uridililação de GlnB é detectado pelo domínio N-terminal de GlnE, que sofre uma mudança conformacional e controla a atividade de adenililtransferase do domínio C-terminal desta enzima. Desta forma, a proteína GlnE catalisa a adenililação de GS, tornando-a inativa (JAGGI *et al.*, 1997).

Em *E. coli*, a proteína GlnB é controlada alostericamente pela ligação com 2-oxoglutarato e ATP. Em solução a proteína GlnB é um homotrímero e cada subunidade possui um sítio de ligação de 2-oxoglutarato e de ATP (KAMBEROV *et al.*, 1995; JIANG *et al.*, 1998c). Em concentrações fisiológicas de ATP, os três sítios de ligação ao ATP estão ocupados. Em concentrações fisiológicas de 2-oxoglutarato, somente um sítio é ocupado com alta afinidade. A ocupação desse primeiro sítio reduz a afinidade do 2-oxoglutarato para ligação às outras subunidades (JIANG *et al.*, 1998a; JIANG *et al.*, 1998b; JIANG *et al.*, 1998c). Quando ligada a uma molécula de 2-oxoglutarato e a três moléculas de ATP, a proteína GlnB desuridilada interage com as proteínas NtrB e GlnE. No entanto, em altas concentrações de 2-oxoglutarato, quando os três sítios de GlnB desuridilada estão ocupados, NtrB retém a atividade de quinase, o que resulta na fosforilação e ativação de NtrC (KAMBEROV *et al.*, 1995; LIU & MAGASANIK, 1995; JIANG *et al.*, 1998a; JIANG *et al.*, 1998b; JIANG *et al.*, 1998c; JIANG & NINFA, 1999). Embora a proteína GlnB desuridilada e saturada com 2-oxoglutarato seja capaz de interagir com NtrB e GlnE, o complexo formado entre essas proteínas não modifica suas atividades, ou seja, NtrB retém sua atividade de quinase e GlnE de removedora de grupamentos adenilil (PIOSZAK *et al.*, 2000).

A proteína GlnK também é substrato para as reações de uridilação e desuridilação catalisadas por GlnD, de forma semelhante à GlnB. Embora a taxa de uridilação da proteína GlnK pela proteína GlnD seja similar à de GlnB, a taxa de desuridilação de GlnK-UMP é cerca de dez vezes menor que a taxa de desuridilação de GlnB-UMP (ATKINSON & NINFA, 1999). Entretanto, GlnK também interage fracamente com GlnE (van HEESWIJK *et al.*, 1996; ATKINSON & NINFA, 1999), de forma que na presença de GlnB, a presença de GlnK não influencia o nível de adenilação de GS. Por outro lado, GlnK interage com NtrB de modo semelhante à GlnB, modulando atividade de quinase/fosfatase de NtrB e, aparentemente, esta modulação em condições de extrema limitação de nitrogênio é essencial para a sobrevivência de *E. coli* (ATKINSON & NINFA, 1999).

Em *E. coli*, o gene *glnK* é co-transcrito com o gene *amtB*, que codifica para uma proteína de membrana envolvida com a captação de amônio (van HEESWIJK *et al.*, 1996; THOMAS *et al.*, 2000). Em altas concentrações de amônio, a proteína GlnK livre liga-se à proteína AmtB bloqueando a passagem de amônio por este

canal de transporte (COUTTS *et al.*, 2002). A proteína GlnB somente interage com AmtB na ausência de GlnK, como demonstrado em mutantes *glnK⁻* de *E. coli* (COUTTS *et al.*, 2002).

As diferentes funções desempenhadas por GlnB e GlnK são atribuídas, principalmente, ao padrão de expressão dessas proteínas (ATKINSON *et al.*, 2002). A proteína GlnB é expressa constitutivamente enquanto a expressão do gene *glnK* é dependente de NtrC-P, como demonstrado pela ausência de expressão do gene *glnK* no mutante *glnB⁻ ntrC⁻* (van HEESWIJK *et al.*, 1996; ATKINSON *et al.*, 2002). Entretanto, no mutante duplo *glnB⁻ glnK⁻* de *E. coli*, a proteína GlnB pode ser funcionalmente convertida a GlnK quando expressa a partir do promotor do gene *glnK* e GlnK pode ser convertida a GlnB quando expressa constitutivamente a partir de um plasmídeo (ATKINSON *et al.*, 2002).

Em um mutante *glnB⁻* de *E. coli*, a regulação por amônio da adenililação de GS é equivalente à estirpe selvagem, embora GlnK seja 40 vezes menos eficiente que GlnB na adenililação de GS (ATKINSON & NINFA, 1999). A proteína GlnK também interage com NtrB promovendo a desfosforilação de NtrC-P, o que explica porque o mutante duplo *glnB⁻ glnK⁻* apresenta deficiência de crescimento e o mutante *glnB⁻* não. No mutante duplo *glnB⁻ glnK⁻*, NtrC está permanentemente fosforilada, o que provoca a expressão constitutiva dos genes dependentes de NtrC-P, como o gene *nac*. A proteína Nac reprime a expressão do gene *serA*, provocando assim, a depleção dos aminoácidos serina e glicina e deficiência de crescimento (BLAUWKAMP & NINFA, 2002a). Nos mutantes *glnB⁻* ou *glnK⁻* esta deficiência de crescimento não ocorre, pois a presença de GlnB e GlnK promove a desfosforilação de NtrC através da interação com NtrB (BLAUWKAMP & NINFA, 2002b).

Como já discutido, a atividade das proteínas GlnB e GlnK é modulada por ligação com 2-oxoglutarato (JIANG *et al.*, 1998a, JIANG *et al.*, 1998b; ATKINSON & NINFA, 1999). Este efeito levou a propor-se que a proteína GlnB atue na célula integrando os sinais dos níveis de nitrogênio (por uridililação) com um sinal do metabolismo central do carbono (2-oxoglutarato) para coordenar a expressão das enzimas-chave da assimilação de nitrogênio em resposta aos níveis celulares de nitrogênio e carbono. Outra indicação da regulação coordenada do metabolismo do nitrogênio e carbono foi demonstrada pela regulação da expressão do operon *glnAntrBC* (BACKMAN *et al.*, 1981). A transcrição desse operon é controlada por

três promotores que estão sob controle dos níveis de nitrogênio e carbono (BUENO *et al.*, 1985; HUNT & MAGASANIK, 1985). Os promotores *glnAp1* e *glnAp2* estão à montante do gene *glnA* e o promotor *ntrBp* encontra-se entre os genes *glnA* e *ntrB* (BUENO *et al.*, 1985; HUNT & MAGASANIK, 1985). Os promotores *glnAp1* e *ntrBp* são promotores fracos, dependentes de σ^{70} (HUNT & MAGASANIK, 1985). O promotor *glnAp1* requer a ligação do complexo CRP-AMPc à uma sequência ativadora à montante de *glnAp1* para sua ativação (TIAN *et al.*, 2001). O complexo CRP-AMPc é formado quando as células crescem em meio suplementado com uma fonte de carbono que não é transportada pelo sistema fosfotransferase (PTS) (PASTAN & ADHYA, 1976; BOTSFORD & HARMAN, 1992). A utilização de carboidratos transportados pelo sistema PTS, como glucose, promove uma diminuição dos níveis de cAMP com conseqüente dissociação do complexo CRP-AMPc, causando repressão catabólica de vários genes (PASTAN & ADHYA, 1976; BOTSFORD & HARMAN, 1992).

O promotor *glnAp2* é um promotor forte localizado 116 pb à jusante do promotor *glnAp1* e ativado por NtrC-P. Além de ativar a transcrição de *glnAp2*, NtrC-P reprime a expressão de *glnAp1* e, dessa forma, quando os níveis de NtrC-P estão elevados durante o crescimento em baixas concentrações de nitrogênio, o operon *glnAntrBC* é transcrito quase que exclusivamente a partir de *glnAp2* (MAGASANIK, 1996). A transcrição a partir de *glnAp2* também responde à repressão catabólica. A formação do complexo CRP-AMPc diminui em 21 vezes a transcrição a partir de *glnAp2* (TIAN *et al.*, 2001), mas os mecanismos que geram tal efeito ainda precisam ser elucidados. FORCHHAMMER & MAHESWARAN (2003) sugerem que o efeito da fonte de carbono na expressão de genes dependentes de NtrC-P é mediado pela captação de glutamina dependente de AMPc, o que conseqüentemente afeta o sistema sinalizador das proteínas do tipo PII que é sensível aos níveis de glutamina.

Em *Klebsiella pneumoniae*, um diazotrofo Gram-negativo entérico, a transcrição dos genes envolvidos com a fixação do nitrogênio (genes *nif*) é dependente da proteína ativadora transcricional NifA. Os genes *nif* codificam para o complexo da nitrogenase que é composto por duas metaloproteínas: a proteína-MoFe (dinitrogenase ou NifDK), um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ transcrito pelo genes *nifDK*, e a proteína-Fe (dinitrogenase redutase ou NifH), um homodímero γ_2 transcrito pelo gene *nifH* (EADY, 1986; DEAN *et al.*, 1993).

O complexo da nitrogenase é responsável pela redução do nitrogênio atmosférico através da seguinte reação (POSTGATE, 1998):



O gene *nifA* é co-transcrito com o gene *nifL* que codifica para a flavoproteína NifL. A proteína NifL interage com a proteína NifA, modulando a atividade de NifA de acordo com as concentrações intracelulares de nitrogênio e oxigênio (DRUMMOND & WOOTTON, 1987; WOOTTON & DRUMMOND, 1989; SCHMITZ, 1997). Em altas concentrações de amônio e/ou oxigênio, NifL inibe a atividade da proteína NifA. Resultados obtidos por BARRET *et al.* (2001) levaram esses autores a sugerir que a proteína NifL controle a ligação da proteína NifA ao DNA, a atividade catalítica de NifA e, talvez, a interação de NifA com a RNA polimerase. Quando os níveis de amônio e/ou oxigênio diminuem, a proteína GlnK, uridililada ou não, impede a formação do complexo NifL-NifA e NifA torna-se ativa (Figura 2A)(BARRET *et al.*, 2001).

Apesar da alta identidade entre GlnB e GlnK de *K. pneumoniae* (67%), a proteína GlnB, em concentrações fisiológicas, não promove a dissociação do complexo NifL-NifA. Porém quando superexpressa, GlnB, à semelhança de GlnK, impede a formação do complexo NifL-NifA (ARCONDÉGUY *et al.*, 1999). Como a atividade da proteína NifA de *K. pneumoniae*, em presença de GlnK de *E. coli*, é maior no mutante duplo *glnB⁻ glnK⁻* do que no mutante *glnK⁻* de *E. coli*, ARCONDÉGUY *et al.* (1999) sugerem que a proteína GlnB pode antagonizar o efeito de GlnK sobre o complexo NifL-NifA, devido à formação de heterotrímeros entre as proteínas GlnB e GlnK, com a conseqüente redução da atividade de GlnK. Além de GlnK, os produtos dos genes *ntrB*, *ntrC*, e *glnD*, são necessários para a dissociação do complexo NifL-NifA de *K. pneumoniae* em diferentes mutantes de *E. coli*, na ausência de amônio (HE *et al.*, 1997; HE *et al.*, 1998). Em *K. pneumoniae*, GlnK é codificada a partir do operon *glnKamtB*, que é dependente de NtrC (JACK *et al.*, 1999).

1.3.2 Assimilação e Metabolismo do Nitrogênio em Diazotrofos Não-Entéricos

As proteínas da família PII também foram identificadas em organismos diazotróficos gram-negativos não-entéricos. *Azotobacter vinelandii*, um diazotrofo da subdivisão γ das proteobactérias, possui somente uma proteína do tipo PII, denominada de GlnK. Nesse organismo, a proteína GlnK é transcrita a partir do operon *glnKatmB* que é dependente de σ^{70} (MELETZUS *et al.*, 1998). O gene *amtB* de *A. vinelandii* codifica para uma proteína de membrana envolvida com a captação de amônio. A proteína AmtB de *A. vinelandii* apresenta maior homologia com a proteína AmtB de *Bacillus subtilis* (41% de identidade e 56% de similaridade) (WRAY *et al.*, 1994; MELETZUS *et al.*, 1998). Sob condições limitantes de nitrogênio, mutantes *amtB*⁻ de *A. vinelandii* apresentam crescimento semelhante ao da estirpe selvagem, mas são incapazes de captar metilamônio (análogo estrutural do amônio), como observado nos mutantes *amtB*⁻ de *Corynebacterium glutamicum* (SIEWE *et al.*, 1996) e *Azospirillum brasilense* (van DOMMELEN *et al.*, 1998).

Semelhante ao que ocorre em *K. pneumoniae*, a transcrição dos genes *nif*, em *A. vinelandii*, é dependente da proteína NifA (BALI *et al.*, 1992; BLANCO *et al.*, 1993; RUDNICK *et al.*, 1997). Entretanto, a proteína GlnK desuridilada estimula a formação do complexo NifL-NifA em *A. vinelandii* (LITTLE *et al.*, 2000). A formação deste complexo também é estimulada por ADP e aliviada por 2-oxoglutarato que contrabalanceia o efeito inibidor do ADP em resposta aos níveis de carbono (LITTLE *et al.*, 2000). A proteína GlnB de *E. coli*, mas não a GlnK, é capaz de estimular a formação do complexo NifL-NifA de *A. vinelandii* (LITTLE *et al.*, 2000).

Mutações deletérias no gene *glnA* de *A. vinelandii* são letais nesse organismo, pois a GS é a única enzima existente para a assimilação de amônio e não há sistemas de transporte para a glutamina em *A. vinelandii* (TOUKDARIAN *et al.*, 1990; COLNAGHI *et al.*, 2001). Mutações deletérias no gene *glnD* também são letais nessas estirpes porque a proteína GlnK não pode ser uridilada, impedindo a desadenililação de GS, tornando-a permanentemente inativa (COLNAGHI *et al.*, 2001). As tentativas de obtenção de mutantes nulos *glnK* de *A. vinelandii* também falharam. Esses mutantes são letais devido à incompleta desadenililação de GS e a um efeito sobre alguma outra função celular vital (MELETZUS *et al.*, 1998).

Em *Herbaspirillum seropedicae*, um diazotrofo da subdivisão β das proteobactérias, o gene *glnB* é um gene monocistrônico, expresso constitutivamente a partir de um promotor do tipo σ^{70} (BENELLI, 1997). A proteína GlnB de *H. seropedicae* é uridililada pelo extrato livre de células deste organismo e pela proteína GlnD de *E. coli* (BENELLI *et al.*, 2001). A uridililação de GlnB requer a presença de ATP ou 2-oxoglutarato, sendo que as maiores taxas de uridililação ocorrem na presença de ambos. A desuridililação de GlnB-UMP pela GlnD de *H. seropedicae* requer a presença de glutamina e é inibida por ATP e 2-oxoglutarato (BENELLI *et al.*, 2001). Em mutantes *ntrB⁻* e *ntrC⁻* de *H. seropedicae*, a atividade de GS é baixa, independentemente dos níveis de nitrogênio (PERSUHN *et al.*, 2000).

A segunda proteína do tipo PII de *H. seropedicae*, a proteína GlnK, é codificada pelo gene *glnK*, que faz parte do operon *orf1glnKamtB*, expresso a partir de um promotor do tipo σ^{54} . O gene *orf1* codifica para uma provável proteína periplasmática de função desconhecida, e o gene *amtB* codifica para a proteína de membrana AmtB. Mutantes *amtB⁻* de *H. seropedicae* são incapazes de captar metilamônio e de regular adequadamente a atividade da proteína NifH após adição de amônio (NOINDORF, 2002; NOINDORF *et al.*, 2005).

Embora vários genes relacionados com a fixação de nitrogênio tenham sido identificados em *H. seropedicae*, o gene *nifL* não foi detectado (SOUZA *et al.*, 1991a; SOUZA *et al.*, 1991b; MACHADO *et al.*, 1996; BENELLI *et al.*, 1997; PEDROSA *et al.*, 1997; KLASSEN *et al.*, 1999; PEDROSA *et al.*, 2001; NOINDORF, 2002). Neste organismo, a expressão do gene *nifA* é insensível aos níveis de oxigênio, mas é reprimida por amônio e dependente de NtrC (SOUZA *et al.*, 2000; WASSEM *et al.*, 2000). Em *H. seropedicae*, a atividade de NifA é controlada tanto pelos níveis de amônio quanto pelos níveis de oxigênio (SOUZA *et al.*, 1999).

Em *A. brasilense*, um diazotrofo da subdivisão α das proteobactérias, foram identificadas duas proteínas do tipo PII, denominadas GlnB e GlnZ, que participam do sistema regulador dos níveis de nitrogênio deste organismo (de ZAMAROCZY *et al.*, 1990; de ZAMAROCZY *et al.*, 1996; de ZAMAROCZY *et al.*, 1998). O gene *glnB* faz parte do operon *glnBA*, que pode ser transcrito a partir de três promotores diferentes utilizados seletivamente, de acordo com os níveis celulares de nitrogênio (de ZAMAROCZY *et al.*, 1993). Em condições de excesso de amônio, a transcrição

de *glnB* ocorre a partir de um promotor do tipo σ^{70} e a partir de um promotor localizado à 45pb de *glnA*, enquanto que em condições limitantes de nitrogênio, a transcrição ocorre a partir de um promotor do tipo σ^{54} , com maior eficiência e independente de NtrC (de ZAMAROCZY *et al.*, 1990; de ZAMAROCZY *et al.*, 1993). Por outro lado, a expressão do gene *glnZ* é dependente de NtrC e σ^{54} , sendo portanto regulada pela disponibilidade de nitrogênio (de ZAMAROCZY *et al.*, 1998).

O mutante *glnB*⁻ de *A. brasilense* apresenta um flagelo polar e vários flagelos laterais como na estirpe selvagem, mas sua capacidade de mobilidade em meio semi-sólido é reduzida pela metade, independente da concentração de amônio no meio, provavelmente devido a um defeito de GlnB no controle do metabolismo energético (de ZAMAROCZY *et al.*, 1996). O gene *amtB* de *A. brasilense* não faz parte de um operon do tipo *glnKamtB*, não estando relacionado a nenhuma proteína do tipo PII no genoma, diferente do observado em outros organismos (de ZAMAROCZY *et al.*, 1996). Assim como em *E. coli*, as proteínas GlnB e GlnZ de *A. brasilense* são encontradas ligadas à membrana após aumento das concentrações de amônio (COUTTS *et al.*, 2002; JAVELLE *et al.*, 2004; HUERGO *et al.*, 2006).

Em *A. brasilense*, o gene *nifA* aparentemente é expresso na presença de oxigênio e/ou amônio e de maneira independente de GlnB (FADEL-PICHETH *et al.*, 1999). Assim como em *H. seropedicae*, nenhum gene homólogo ao *nifL* foi detectado em *A. brasilense* (LIANG *et al.*, 1991; LIANG *et al.*, 1992; LIANG *et al.*, 1993). Em altas concentrações de amônio, a proteína NifA está inativa e, embora GlnB seja capaz de ligar-se à NifA, o complexo formado permanece inativo (ARSENE *et al.*, 1996; van DOMMELEN *et al.*, 2002). Em baixas concentrações de nitrogênio, a proteína GlnB-UMP liga-se ao domínio GAF N-terminal de NifA, o que resulta na ativação de NifA (ARSENE *et al.*, 1996; VAN DOMMELEN *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2005). Mutantes NifA-Y18/53F, de *A. brasilense*, apresentam alta atividade de nitrogenase regulada por amônio mas independente de GlnB (CHEN *et al.*, 2005).

Em baixas concentrações de nitrogênio, a proteína NifA ativa a transcrição dos genes *nif* (que codificam para o complexo da nitrogenase). A atividade do complexo da nitrogenase é controlada por ADP-ribosilação da proteína NifH (dinitrogenase redutase), em *A. brasilense*. Na presença de amônio, a enzima dinitrogenase redutase ADP-ribosiltransferase (DRAT) transfere uma ADP-ribose, do

cofator NAD, para o resíduo de Arg-101 de uma subunidade da dinitrogenase redutase, inativando esta enzima. Quando os níveis de amônio diminuem, a enzima glicohidrolase ativadora da dinitrogenase redutase (DRAG) remove o grupamento ADP-ribose, restaurando a atividade da nitrogenase (LUDDEN & ROBERTS, 1989; ZHANG *et al.*, 1997). O sistema DRAT-DRAG regula negativamente a atividade da nitrogenase em resposta ao aumento das concentrações de amônio ou à limitação de energia frente à mudança para anaerobiose, em *A. brasilense* (ZHANG *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 1993). Em *A. brasilense*, a proteína AmtB é necessária para a adequada regulação da proteína NifH. Em altas concentrações de nitrogênio, a proteína DRAG é seqüestrada para a membrana de maneira dependente de AmtB e GlnZ e/ou GlnB (HUERGO *et al.*, 2006).

Rhodospirillum rubrum, um diazotrofo fotossintético da subdivisão α das proteobactérias, possui três proteínas do tipo PII denominadas de GlnB, GlnJ e GlnK, codificadas pelos genes *glnB*, *glnJ* e *glnK*, respectivamente (JOHANSSON & NORDLUND, 1996; ZHANG *et al.*, 2001). O gene *glnB* faz parte do operon *glnBglnA* que é transcrito à partir de um promotor fraco do tipo σ^{70} (*glnBp1*) e de um promotor forte do tipo σ^{54} (*glnBp2*) (JOHANSSON & NORDLUND, 1996; CHENG *et al.*, 1999). Tanto o *glnBp1* quanto o *glnBp2* são ativados em presença de amônio e em condições limitantes de nitrogênio, embora a atividade do promotor *glnBp2* seja maior em condições de fixação de nitrogênio (CARLBERG & NORDLUND, 1991; JOHANSSON & NORDLUND, 1996). O gene *glnJ* faz parte do operon *ilvEglnJamtB1* que codifica para uma amidotranferase, para a proteína GlnJ e para a proteína AmtB1, respectivamente. A proteína AmtB1 de *R. rubrum* apresenta 67% de identidade com a proteína AmtB de *A. brasilense* (ZHANG *et al.*, 2001). O gene *glnK* de *R. rubrum* aparentemente é cotranscrito com o gene *amtB2* que codifica para uma proteína que apresenta aproximadamente 20% de identidade com a proteína AmtB de *E. coli*. (ZHANG *et al.*, 2001).

Em *R. rubrum*, a transcrição dos genes *nif* é controlada pela proteína NifA de maneira independente das proteínas NtrB e NtrC (ZHANG *et al.*, 1995). Nesse organismo, assim como em *A. brasilense*, a atividade do complexo da nitrogenase também é controlada por ADP-ribosilação da nitrogenase redutase (ZHANG *et al.*, 1992; MASEPOHL *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1993). Em *R. rubrum*, o sistema DRAT-DRAG regula negativamente a atividade da nitrogenase em resposta ao

aumento das concentrações de amônio, ou à limitação de energia proveniente da diminuição da quantidade de luz (MASEPOHL *et al.*, 1993). Assim como em outros organismos, as proteínas do tipo PII de *R. rubrum* são uridililadas pela proteína GlnD, em baixas concentrações de amônio. Entretanto, apenas as proteínas GlnB e GlnJ são capazes, sozinhas, de regular adequadamente o sistema DRAT-DRAG nesse organismo (ZHANG *et al.*, 2001).

Diferente do observado em outros organismos, em *R. rubrum*, a expressão da proteína NifA não é regulada por amônio ou por oxigênio e nenhum gene homólogo a *nifL* foi detectado. A presença da proteína GlnB-UMP é essencial para a ativação de NifA, porém as proteínas GlnK e GlnJ não estão envolvidas nesse processo (ZHANG *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2001). Assim como em outros diazotrofos, em *R. rubrum*, o amônio é assimilado pela via GS/GOGAT e a enzima GS é adenililada ou ADP-ribosilada nesse organismo (WOELHE *et al.*, 1990). Porém, nenhuma das proteínas do tipo PII de *R. rubrum* é capaz, sozinha, de regular adequadamente a adenililação de GS (ZHANG *et al.*, 2001).

Em *R. rubrum*, a regulação da fotossíntese, da assimilação de dióxido de carbono e da fixação de nitrogênio é afetada em mutantes *ccbM*, os quais não possuem a enzima chave do ciclo Calvin-Benson Bassham, denominada de ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase ou RubisCO (JOSHI & TABITA, 1996; QUIAN & TABITA, 1996). Esses mutantes apresentam alta atividade de nitrogenase mesmo em presença de amônio, e alteração da expressão dos genes *glnB* e *glnK*, indicando que a expressão dos genes *nif* e a regulação do sistema DRAT-DRAG também está alterada (JOSHI & TABITA, 1996; QUIAN & TABITA, 1998).

1.3.3 Assimilação e Metabolismo do Nitrogênio em Cianobactérias

As proteínas do tipo PII também foram identificadas em cianobactérias (SANDERS *et al.*, 1989; HARRISON *et al.*, 1990; TSINOREMAS *et al.*, 1991). Em *Synechocystis* sp. estirpe PCC6803, o gene *glnK* (previamente denominado de *glnB*) é transcrito a partir de dois promotores: um dependente de σ^{70} e outro dependente da proteína NtcA, um fator de transcrição da família de receptores AMPc, que controla a expressão dos genes relacionados com a utilização de fontes alternativas de nitrogênio, como os genes *glnA*, *amt1*, *ntcA* e *nir* (VEGAS-PALAS *et al.*, 1992).

Os genes *amt1* e *nir* codificam para um canal transportador de amônio e para a proteína nitrito redutase, respectivamente, em cianobactérias (HERRERO *et al.*, 2001; ALDEHNI *et al.*, 2003; PAZ-YEPES *et al.*, 2003). A expressão de *glnA* responde aos níveis celulares de nitrogênio nesses organismos (FLORES *et al.*, 1999). Quando a relação C/N é alta, a proteína GlnK regula positivamente a ligação da proteína NtcA ao DNA, ativando a transcrição de *glnA*. Quando a relação C/N é baixa, a expressão de *glnA* diminui (COHEN-KUPIEC *et al.*, 1995; FLORES *et al.*, 1999; ALDEHNI *et al.*, 2003; PAZ-YEPES *et al.*, 2003).

A transcrição do gene *glnK* também está sob controle do estado redox da célula em cianobactérias, pois os níveis do mRNA de *glnK* diminuem quando as células são transferidas para o escuro ou quando são incubadas na presença de inibidores da fotossíntese (FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC, 1994).

Embora a proteína GlnK de cianobactérias apresente o resíduo Tyr51, o mesmo não é uridililado nestes organismos. A modificação pós-traducional ocorre por fosforilação do resíduo Ser49, uma modificação que não é controlada por uma enzima bifuncional, mas por duas enzimas distintas, uma quinase e a PphA fosfatase (Figura 2B) (FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC, 1994; FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC, 1995b; IRMLER *et al.*, 1997; IRMLER & FORCHHAMMER, 2001). Altas concentrações de ATP e 2-oxoglutarato estimulam a atividade da quinase e inibem a atividade da PphA fosfatase (IRMLER & FORCHHAMMER, 2001). A proteína PphA é uma proteína monomérica com 28,5 kDa e toda a sua sequência de aminoácidos compreende o domínio catalítico das proteínas da família de fosfatases PP2C, não possuindo extensões N- ou C-terminais que poderiam atuar como reguladoras ou determinantes da ligação ao substrato (IRMLER & FORCHHAMMER, 2001). Na presença de amônio, a proteína GlnK é desfosforilada pela proteína PphA numa reação dependente de íons Mg^{2+} ou Mn^{2+} e inibida por PO_4^- (IRMLER & FORCHHAMMER, 2001).

Em *Synechococcus elongatus* estirpe PCC7942, a proteína GlnK forma um complexo estável com a enzima N-acetilglutamato quinase (NAGK) (MAHESWARAN *et al.*, 2004). A proteína NAGK é codificada pelo gene *argB* e catalisa a etapa-chave na síntese da arginina, um aminoácido utilizado na formação do copolímero de reserva de nitrogênio denominado de cianoficina, em muitas espécies de cianobactérias (ALLEN, 1988; CALDOVIC & TUCHMAN, 2003). Em altas

concentrações de nitrogênio, a proteína GlnK está desfosforilada e ativa a proteína NAGK, aumentando 40 vezes a atividade desta (MAHESWARAN *et al.*, 2004). A presença do resíduo Ser49 parece ser essencial para a interação da proteína GlnK com a NAGK, pois as proteínas mutantes GlnK Ser49-Ala/Glu não foram capazes de formar complexos estáveis com a proteína NAGK (MAHESWARAN *et al.*, 2004). A ligação de GlnK à NAGK não requer efetores. Entretanto, a ligação do 2-oxoglutarato, em presença de ATP, desestabiliza o complexo, um efeito modulado por íons divalentes. Assim, o complexo GlnK-NAGK parece sensoriar o estado energético da célula bem como a relação carbono/nitrogênio que é refletida pelos níveis de 2-oxoglutarato (FORCHHAMMER *et al.*, 1999; MAHESWARAN *et al.*, 2004).

Em baixas concentrações de nitrogênio, a proteína GlnK está fosforilada e não interage com a enzima NAGK, que na forma livre é fortemente inibida por arginina. A diminuição da síntese da arginina, em baixas concentrações de nitrogênio, previne a depleção de glutamato e o consumo de carbamil-fosfato, metabólitos que desempenham um papel-chave no metabolismo central. Assim, o controle da síntese da arginina pode ser uma importante função da proteína GlnK em cianobactérias (MAHESWARAN *et al.*, 2004). Mutantes *glnK* de *S. elongatus* têm fenótipo pleiotrópico: o balanço carbono/nitrogênio é desordenado e tais mutantes são incapazes de adaptação rápida em condições de mudança das concentrações de nitrogênio, carbono e iluminação (FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC, 1995b).

A fosforilação de GlnK, em cianobactérias, depende primeiramente dos níveis de nitrogênio e as variações dependentes das condições de luz são mediadas através do metabolismo de nitrato e, conseqüentemente, da fixação de dióxido de carbono. Nesses organismos, a proteína GlnK também é necessária para regular a atividade do transportador de nitrito em resposta às concentrações de amônio e dióxido de carbono. Em altas concentrações de amônio, GlnK inibe a captação de nitrito pelo transportador (FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC, 1995b; LEE *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2000). Assim, a proteína GlnK parece estar envolvida no controle do metabolismo de carbono e de nitrogênio em *Synechococcus* sp. (FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC, 1994; FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC, 1995a).

1.3.4 Assimilação de Nitrogênio em Archaea

A regulação do metabolismo do nitrogênio em archaea está começando a ser investigada. Grande parte desses organismos apresenta proteínas homólogas às proteínas GlnB, GlnK e AmtB de *E. coli*. Entretanto, as proteínas do tipo PII de arqueas não apresentam os resíduos Ser49 ou Tyr51, sítios de modificação covalente em outros organismos, nem tão pouco possuem um sistema semelhante ao NTR de enterobactérias. Gene homólogo ao *glnD* não foi encontrado em nenhuma arquea até agora (EHLERS *et al.*, 2002).

Em *Methanosarcina mazei* estirpe Gö1, um metanógeno diazotrófico, a atividade da enzima glutamina sintetase (GlnA₁) não parece ser controlada por adenililação. EHLERS *et al.* (2005) demonstraram que a proteína GlnK₁ (homóloga à GlnK de *E. coli*) controla a atividade de GlnA₁, em *M. mazei*. Em resposta ao choque de amônio, GlnK₁ forma um complexo estável com GlnA₁, inativando-a. Quando os níveis de nitrogênio diminuem, a atividade de GlnA₁ é fortemente estimulada por 2-oxoglutarato. Como GlnK₁ só é expressa sob condições limitantes de nitrogênio e altas concentrações de 2-oxoglutarato ativam GlnA₁ na ausência de GlnK₁, EHLERS *et al.* (2005) propõem que altas concentrações de 2-oxoglutarato favorecem uma conformação tridimensional de GlnA₁ desfavorável à inibição por GlnK₁, embora não impeça a formação do complexo GlnK₁-GlnA₁ (EHLERS *et al.*, 2002; EHLERS *et al.*, 2005).

Em *Methanococcus maripaludis*, outro metanógeno diazotrófico, as proteínas do tipo PII são codificadas pelos genes *nifl*₁ e *nifl*₂, que fazem parte do grupo de genes *nif* (SOUILLARD & SIBOLD, 1989; CHIEN & ZINDER, 1996; KESSLER *et al.*, 1998). Nifl₁ e Nifl₂ são necessárias para o controle da atividade de NifH (KESSLER *et al.*, 2001).

Análises das seqüências genômicas de archaea revelaram que genes do tipo *amt*₁ encontram-se relacionados aos genes do tipo *glnK*₁. A estrutura cristalográfica da proteína Amt-1 de *Archaeoglobus fulgidus* foi determinada (ANDRADE *et al.*, 2005). A estrutura desta proteína é semelhante à da proteína AmtB de *E. coli*, e ANDRADE *et al.* (2005) sugerem que a proteína GlnB-1 (homóloga à GlnB de *E. coli*) liga-se à região C-terminal de Amt1, que está voltada para o citoplasma,

bloqueando a passagem de amônio pelos três canais individuais de Amt-1 (KHADEMI *et al.*, 2004; ZHENG *et al.*, 2004; ANDRADE *et al.*, 2005).

1.3.5 Assimilação de Nitrogênio em Bactérias Gram-Positivas

Nas bactérias gram-positivas existem diferentes mecanismos de regulação dos níveis de nitrogênio. Nos organismos com alta porcentagem G + C, como o actinomiceto *Streptomyces coelicolor*, nenhum gene semelhante ao *ntrB* ou ao *ntrC* foi detectado e a única proteína do tipo PII identificada foi denominada de GlnK, cujo gene, *glnK*, parece ser cotranscrito com genes homólogos ao *amtB* e ao *glnD*, formando o operon *amtBglnKglnD* (FINK *et al.*, 2002). A expressão do operon *amtBglnKglnD* nesse organismo, é regulada positivamente pelas proteínas GlnR e GlnRII, em condições limitantes de nitrogênio (FINK *et al.*, 2002). As proteínas GlnR e GlnRII são ativadores transcricionais da família OmpR que também ativam a transcrição do gene *glnA*, porém de maneira independente dos níveis celulares de nitrogênio (FINK *et al.*, 2002). Mutantes *glnR*⁻ são auxotróficos para glutamina, mas mutantes *glnRII*⁻ são capazes de crescer em meio sem glutamina (FINK *et al.*, 2002).

A atividade da enzima GSI (produto de gene *glnA*) também é controlada por adenililação/desadenililação pela proteína GlnE, em *S. coelicolor*, à semelhança do que ocorre em enterobactérias (FINK *et al.*, 1999; JAKOBY *et al.*, 1999). Porém, naquele organismo, as proteínas GlnD e/ou GlnK não participam de regulação pós-traducional de GSI, pois mutantes *glnK*⁻ ou *glnD*⁻ possuem um padrão normal de ativação/desativação de GSI em resposta à disponibilidade de amônio (HESKETH *et al.*, 2002).

HESKETH *et al.* (2002) demonstraram que em *S. coelicolor*, a proteína GlnK está sujeita a dois tipos de regulação pós-traducional, uma reversível e outra irreversível, de acordo com a disponibilidade de nitrogênio. Na modificação reversível, em condições de limitação de nitrogênio, a proteína GlnD adenilila a proteína GlnK no resíduo Tyr51, o mesmo resíduo que é uridililado em *E. coli*. Ainda, em baixas concentrações de nitrogênio nas células entrando em estado estacionário, GlnK é modificada irreversivelmente pela remoção dos três primeiros resíduos de aminoácidos de sua porção N-terminal (HESKETH *et al.*, 2002).

Em *C. glutamicum*, outro actinomiceto com alta porcentagem de G + C no genoma, o gene *glnK* apresenta uma organização genética semelhante à encontrada em *S. coelicolor* e a atividade de GS também é controlada por adenililação/desadenililação (JAKOBY *et al.*, 1999). A transcrição dos genes envolvidos com o metabolismo do nitrogênio de *C. glutamicum*, é controlada pela proteína AmtR, uma proteína da família TetR (WRAY *et al.*, 1991; JAKOBY *et al.*, 2000; FINK *et al.*, 2002). Neste organismo, os níveis de nitrogênio são sinalizados por amônio e não por glutamina. Quando os níveis de amônio diminuem, a proteína GlnK é adenililada no resíduo Tyr51 pela proteína GlnD (Figura 2C). GlnK-AMP liga-se à proteína repressora AmtR, aliviando a repressão exercida por esta proteína em seus genes-alvo (STRÖSSER *et al.*, 2004). Em *C. glutamicum*, a proteína AmtR regula negativamente a expressão dos genes *glnA* e *gltBD*, que codificam para as enzimas GS e GOGAT, respectivamente (BECKERS *et al.*, 2005; SILBERBACH *et al.*, 2005).

Em altas concentrações de nitrogênio, GlnK desadenililada é seqüestrada para a membrana de *C. glutamicum*, de maneira dependente de AmtB, sendo que o restante de GlnK que permanece no citoplasma é especificamente degradado (STRÖSSER *et al.*, 2004). Sob tais condições, a proteína AmtR reprime a expressão do gene *amtA*, que codifica para um canal de amônio de alta afinidade, e do operon *amtBglnKglnD* (JACOBY *et al.*, 2000; STRÖSSER *et al.*, 2004).

Em *B. subtilis*, um organismo que apresenta baixa porcentagem de G + C, a assimilação de nitrogênio difere significativamente daquela observada em organismos gram-negativos. Em *B. subtilis*, a atividade da GS não é controlada por adenililação ou qualquer outra mudança pós-traducional e não há evidências da existência de um sistema global para a regulação do nitrogênio, análogo ao sistema NTR das enterobactérias. Nesta classe de organismos, a própria GS transmite o sinal de disponibilidade de nitrogênio para as proteínas TnrA e GlnR (DEUEL & STADTMAN, 1970; FISHER & SONENSHEIN, 1984; SCHREIER *et al.*, 1989; FISHER & SONENSHEIN, 1991; WRAY *et al.*, 1994; WRAY & FISHER, 2005).

Em *B. subtilis*, atividade de GS é inibida por glutamina e outros inibidores que se ligam à GS em altas concentrações de amônio (Figura 2D) (SCHREIER *et al.*, 1989; WRAY *et al.*, 1994; WRAY & FISHER, 2005). Assim, GS forma um complexo com TnrA, impedindo a ligação de TnrA ao DNA e, conseqüentemente, a expressão

de seus genes-alvo, tais como o operon *amtBglnK* (previamente denominado *nrgAnrgB*). Quando os níveis intracelulares de nitrogênio diminuem, a proteína TnrA ativa a transcrição do operon *amtBglnK*, que codifica para as proteínas AmtB e GlnK, respectivamente. A proteína GlnK de *B. subtilis* não possui sítios de uridililação ou fosforilação conservados (ATKINSON & FISHER, 1991; WRAY, *et al.*, 1996; FISHER & DÉBARBOUILLÉ, 2002). De acordo com os resultados de DETSCH & STÜLKE (2003), a presença de uma GlnK funcional é essencial para a adequada expressão do operon *amtBglnK*, em condições limitantes de nitrogênio, contrariando os resultados apresentados por WRAY *et al.* (1994). Em *B. subtilis*, a proteína GlnK parece ser necessária para a utilização de nitrato (WRAY *et al.*, 1994).

Em altas concentrações de amônio, a proteína GlnR reprime a expressão do operon *glnRA*, que codifica para as proteínas GlnR e GS, respectivamente, em *B. subtilis*. Nas estirpes expressando uma GS mutante, GS-S186F, a expressão de *glnRA* é constitutiva, reforçando a sugestão de que GS também participe da regulação de GlnR (SCHREIER, *et al.*, 1989; FISHER & SONENSHEIN, 1991; WRAY *et al.*, 1997; FISCHER, 1999; WRAY & FISHER, 2005).

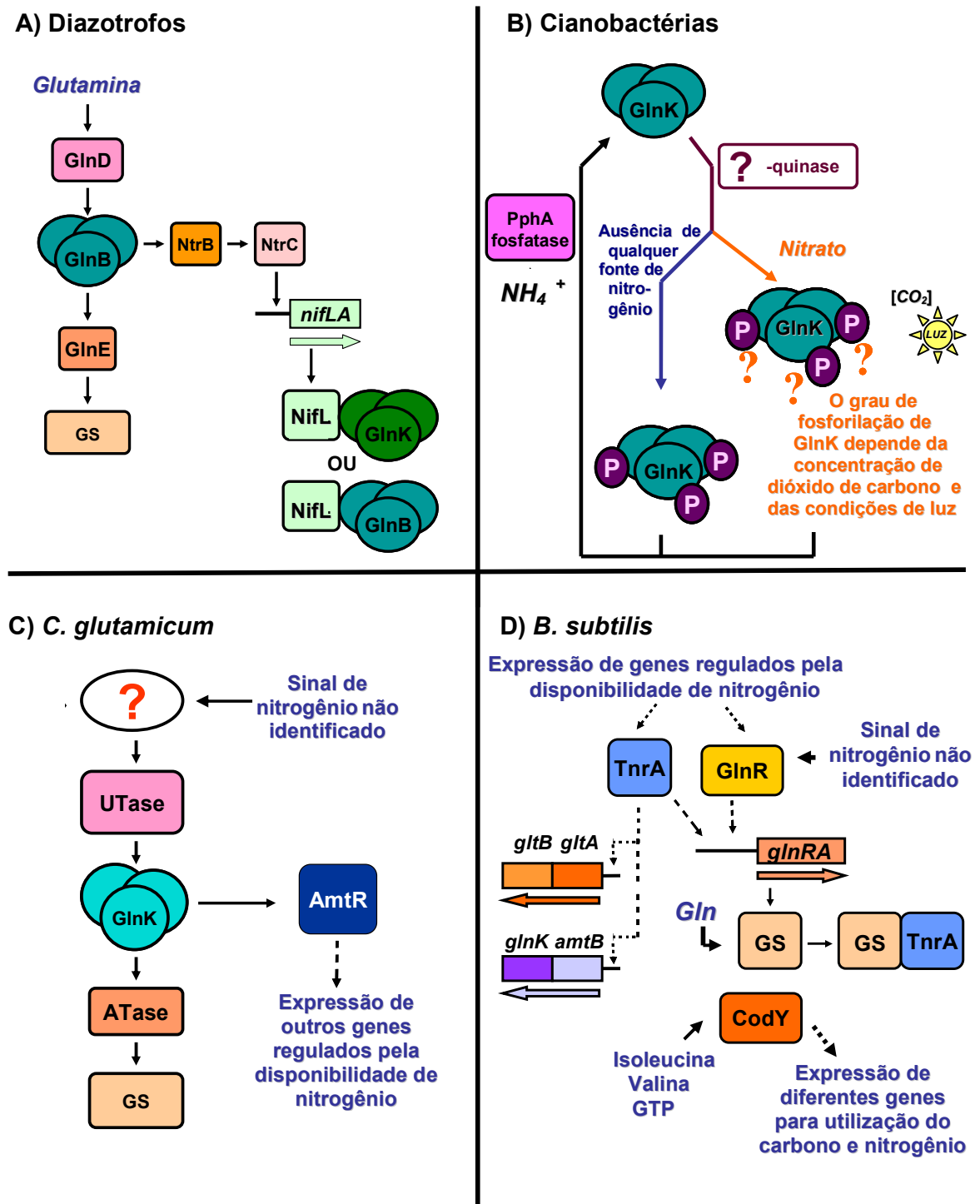
A enzima GOGAT de *B. subtilis* é codificada pelo operon *gltAB* que também tem sua expressão regulada pelos níveis celulares de nitrogênio (FISHER & DÉBARBOUILLÉ, 2002). Na ausência de amônio, a expressão do operon *gltAB* é reprimida por TnrA e ativada pela proteína reguladora GltC em resposta aos níveis celulares de carbono (BOHANNON & SONENSHEIN, 1989; BELITSKY *et al.*, 2000; BELITSKY *et al.*, 2004). A indução do operon *gltAB* também requer a presença de carboidratos que possam ser catabolizados via glicólise e esta indução depende do regulador pleiotrópico do metabolismo de carbono, CcpA (FAIRES *et al.*, 1999; BLENCKE *et al.*, 2003; WACKER *et al.*, 2003; BELITSKY *et al.*, 2004).

Uma terceira proteína reguladora, denominada de CodY, controla negativamente a expressão de muitos genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio, em *B. subtilis* (SLACK *et al.*, 1995; FERSON *et al.*, 1996; FISHER *et al.*, 1996; WRAY *et al.*, 1997). CodY é um repressor transcricional que não apresenta homologia significativa com os reguladores transcricionais caracterizados até agora (STRAUCH & AYAZIFAR, 1995). Em altas concentrações de nitrogênio e carbono, CodY está ativo. A repressão promovida por CodY é aliviada quando há uma rápida transição da fase de crescimento exponencial para a fase estacionária (FISHER *et*

al., 1996). A atividade de CodY é modulada pelos efetores GTP e aminoácidos de cadeia ramificada, como isoleucina e valina, que aumentam a afinidade de CodY pelos seus genes-alvo (RATNAYAKE-LECAMWASAM *et al.*, 2001; SHIVERS & SONENSHEIN, 2004). Assim, a regulação dependente de CodY reflete a condição nutricional geral da célula, enquanto que as proteínas GlnR e TnrA respondem à disponibilidade de nitrogênio.

Em *S. mutans*, uma bactéria gram-positiva com baixa porcentagem de G + C, o gene *glnK* foi identificado e codifica para uma proteína com 113 resíduos de aminoácidos que não possui sítios de uridililação ou fosforilação conservados. O resíduo de Tyr51 foi substituído por um Ile, e o resíduo de Ser49 foi substituído por Gln, o que pode conferir características diferentes no controle do metabolismo do nitrogênio neste organismo (AJDIC *et al.*, 2002). Embora o gene *glnK* tenha sido identificado em *S. mutans*, a função deste gene ainda é desconhecida. Como na maioria dos organismos estudados as proteínas da família PII integram o metabolismo do carbono, nitrogênio e energético, é possível que o produto do gene *glnK* de *S. mutans* seja um importante fator de contato metabólico. Os carboidratos da dieta do hospedeiro, principalmente a sacarose, têm sido associados com a virulência de *S. mutans*, mas na maioria das condições o carboidrato não parece ser o nutriente limitante. Por outro lado, é provável que o metabolismo de carboidratos seja influenciado pela disponibilidade de outros nutrientes importantes. Talvez o principal nutriente em concentração limitante na cavidade bucal seja o nitrogênio. Assim, o entendimento da inter-relação entre o metabolismo de carbono e nitrogênio em *S. mutans*, poderá contribuir para a fisiopatologia da cárie.

FIGURA 2 - REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM DIAZOTROFOS, CIANOACTÉRIAS, *C. glutamicum* E *B. subtilis*



Esquema adaptado de BURKOVSKI (2003).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar a proteína GlnK de *S. mutans*, tendo os seguintes objetivos específicos:

- Clonar o gene *glnK* de *S. mutans*
- Expressar e purificar a proteína GlnK de *S. mutans*
- Caracterizar bioquimicamente a proteína GlnK de *S. mutans*
- Avaliar os efeitos da proteína GlnK de *S. mutans* sobre o complexo NifL-NifA NifL de *K. pneumoniae* em *E. coli*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MÉTODOS GERAIS

3.1.1 Estirpes e Plasmídeos

As estirpes de bactérias e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 2.

3.1.2 Meios de Cultura e Condições de Cultivo

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Broth (LB), LA, Terrific Broth ou NFDM. O meio LB (SAMBROOK *et al.*, 1989) contém triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e cloreto de sódio 10 g/L e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 mol/L. O meio LA apresenta a mesma composição do meio LB com a adição de ágar 15 g/L. O meio Terrific Broth (SAMBROOK *et al.*, 1989) contém triptona 12 g/L, extrato de levedura 24 g/L, glicerol 4 ml/L, K₂HPO₄ 12,54 g/L, KH₂PO₄ 2,32 g/L e o pH foi ajustado para 6,8 com KOH 1mol/L. O meio NFDM (DIXON, 1977) contém MgSO₄.7H₂O 0,1 g/L, Na₂MoO₄.2 H₂O 25 mg/L, FeSO₄.7H₂O 25 mg/L, glucose 20 g/L e foi suplementado com glutamato 5 mmol/L ou cloreto de amônio 20 mmol/L. O pH do meio NFDM foi ajustado para 5,0 com NaOH 1 mol/L. As culturas de *E. coli* foram mantidas em agitador rotatório ou em estufa a 30 ou 37⁰ C.

Os antibióticos foram usados nas seguintes concentrações: ampicilina (250 µg/mL), canamicina (50 µg/mL), cloranfenicol (30 µg/mL), gentamicina (30 µg/mL), estreptomicina (20 ou 80 µg/mL) e tetraciclina (10 µg/mL).

As culturas de *S. mutans* e *E. coli* foram mantidas em glicerol 50% e estocadas à -20⁰ C ou -70⁰ C.

TABELA 2 - ESTIRPES E PLASMÍDEOS

ESTIRPES / PLASMÍDEOS	GENÓTIPO / FENÓTIPO	REFERÊNCIA / FONTE
<i>S. mutans</i> UA159	Estirpe selvagem, Bacteriocina ⁻ , BV ⁺ Gramicidina ⁺	AJDIC et al., 2002
<i>E. coli</i> YMC10	<i>endA1 thi-1 hsdR17 supE44ΔlacU169</i> [Kan ^r -φ(<i>nifH</i> '- 'lacZ)]	CHEN et al., 1982
DH10B	F ⁻ <i>mrcA Δφ80ΔlacZ ΔM 15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR</i> <i>Δ(ara, leu)7697 araD139</i> <i>galU galK nupG rpsL λ⁻</i>	SAMBROOK et al., 1989
RB9065(λDE3)	<i>glnB2306 glnD99::Tn10</i> , Tc ^R (promotor T7 polimerase)	BENELLI et al., 1997
UNF3435	<i>endA1 thi-1 hsdR17 supE44ΔlacU169</i> [Kan ^r -φ(<i>nifH</i> '- 'lacZ)] <i>ΔglnB2306 ΔglnK</i>	ARCONDÉGUY et al., 1999
NCM1686	<i>glnD99::Tn10</i> [Kan ^r -φ(<i>nifH</i> '- 'lacZ)]	HE et al., 1997
BL21 AI	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm araB::T7RNAP-tetA</i>	Invitrogen
PLASMÍDEOS		
pGEM-T	Amp ^R , vetor de clonagem A/T	Promega
pET29a ⁺	Km ^R , pT7	Novagen
pET28b ⁺	Km ^R , pT7	Novagen
pTZ18R	Amp ^R , vetor multifuncional de clonagem e sequenciamento, <i>plac</i>	MEAD et al., 1986
pCC46	Cm ^R , <i>nifLA</i> de <i>K. pneumoniae</i> em pHSG575, <i>plac</i>	CONTRERAS et al., 1991
pWVH149	Amp ^R , <i>glnK</i> de <i>E. coli</i> em pBluescript-II KS+, <i>plac</i>	van HEESWIJK et al., 1996
pDK601	Amp ^R , <i>glnB</i> de <i>E. coli</i> em pUC18 <i>plac</i>	van HEESWIJK et al., 1993
pMEGP1	Amp ^R , <i>glnK</i> de <i>S. mutans</i> em pGEM-T <i>plac</i>	Este trabalho
pMEGP2	Km ^R , <i>glnK</i> de <i>S. mutans</i> em pET29a(+) pT7, Expressa GlnK Sm nativa	Este trabalho
pMEGP3	Km ^R , <i>glnK</i> de <i>S. mutans</i> em pET28a(+) pT7 Expressa GlnK-His-Sm	Este trabalho
pMEGP4	Amp ^R , <i>glnK</i> de <i>S. mutans</i> em pTZ18R, <i>plac</i>	Este trabalho
pMEGP5	Amp ^R , <i>glnK-His</i> de <i>S. mutans</i> (proteína GlnB-His) em pTZ18R, <i>plac</i>	Este trabalho

3.1.3 Manipulação Gênica

As reações de restrição e ligação, e as técnicas de purificação de DNA e eletroporação foram realizadas conforme descrito por SAMBROOK *et al.* (1989).

3.1.4 Amplificação do gene *glnK* de *S. mutans*

O gene *glnK* de *S. mutans* foi amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando como molde o DNA genômico de *S. mutans* UA159, gentilmente cedido por Cvitkovitch, D. G. Nesta reação, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores complementares às regiões N-terminal do gene *glnK* de *S. mutans* (5' - GGAAGTCATATGAAAAAATAG - 3'), contendo um sítio *Nde*I, (bases sublinhadas) e C-terminal do mesmo gene (3'-AGTTTCTCCCTAGGTTCGAAA - 5') contendo um sítio *Bam*HI (bases sublinhadas). A mistura de reação para amplificação continha aproximadamente 20 ng do DNA molde, 10 pmol de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 0,2 mmol/L de dNTP (mistura equimolar de desoxirribonucleotídeos), 1,5 mmol/L de MgCl₂, Taq DNApolimerase (1 U) diluídos em tampão contendo Tris-HCl 20 mmol/L pH 8,6, KCl 100 mmol/L, num volume final de 10 µL. Inicialmente, a reação foi aquecida a 94^o C por 5 minutos (1 ciclo) e em seguida foram realizados 30 ciclos dos seguintes passos: 94^o C por 30 segundos, 40^o C por 30 segundos e 72^o C por 30 segundos e um último ciclo a 72^o C por 10 minutos. A presença do fragmento de aproximadamente 400 pb foi observada após eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X (Tris 10,8 g/L, ácido bórico 5,5 g/L e EDTA 2 mmol/L).

3.1.4.1 Clonagem do gene *glnK* de *S. mutans* no vetor pGEM-T

Para clonagem do gene *glnK* de *S. mutans*, o produto obtido da reação de PCR (item 3.1.4) foi ligado ao vetor pGEM-T. A mistura de ligação foi transformada na estirpe DH10B de *E. coli* e os transformantes foram selecionados em meio LA contendo ampicilina. O DNA plasmidial das colônias obtidas foi isolado, digerido com as enzimas *Xba*I e *Hind*III e então analisado por eletroforese em gel de agarose

1,5% para confirmar a presença do inserto. O plasmídeo contendo o gene *glnK* de *S. mutans* foi denominado de pMEGP1.

3.1.5 Sequenciamento de DNA

O plasmídeo pMEGP1 foi sequenciado para verificar a integridade do gene *glnK*. A reação de sequenciamento continha 200 ng do DNA purificado, 10 pmol/L de *primer* Reverso ou Universal e 4 µL de mistura para sequenciamento DYEnamic ET Terminator (Amersham Biosciences), em um volume final de 10 µL. A reação foi realizada em 30 ciclos de 96^o C por 20 segundos e 60^o C por 1 minuto e trinta segundos. O produto de cada reação foi precipitado utilizando 10 µL de acetato de amônio 7,5 mol/L e 3 volumes de etanol 96% e em seguida lavado duas vezes com 400 µL de etanol 70%. O DNA foi dissolvido em 4 µL de Formamide Loading Buffer (96^o C por 2 minutos) e submetido à eletroforese no sequenciador automático de DNA da Applied Biosystems ABI-PRIMZ 377 (Applied Biosystems).

3.1.6 Clonagem do gene *glnK* de *S. mutans* nos vetores de superexpressão pET29a(+) e pET28b(+)

O plasmídeo pMEGP1 foi digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* para liberar o gene *glnK* de *S. mutans*. O fragmento de aproximadamente 0,4 Kb, contendo o gene *glnK* de *S. mutans*, foi ligado aos vetores pET29a(+) e pET28b(+) digeridos com as mesmas enzimas. Após a incubação, 1 µL das reações de ligação foi eletroporado na estirpe DH10B de *E. coli* e as colônias transformantes foram selecionadas em meio LA contendo canamicina e estreptomicina. O DNA plasmidial das colônias obtidas foi isolado, digerido com as enzimas *XbaI* e *HindIII* e então analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% para confirmar a presença do inserto. Os plasmídeos contendo o gene *glnK* de *S. mutans* inserido nos vetores pET29a(+) e pET28b(+) foram denominados de pMEGP2 e pMEGP3, respectivamente. O plasmídeo pMEGP2 expressava a proteína GlnK de *S. mutans* na forma nativa (GlnK-Sm), enquanto que o plasmídeo pMEGP3 expressava a

proteína GlnK de *S. mutans* ligada pela região N-terminal ao oligopeptídeo MGSSHHHHHSSGLVPRGSH, denominada GlnK-His-Sm.

3.1.7 Clonagem dos genes *glnK* e *glnK-His* de *S. mutans* no vetor pTZ18R

Os plasmídeos pMEGP2 e pMEGP3 foram digeridos com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III para liberar o gene *glnK* de *S. mutans*. Os fragmentos de aproximadamente 0,4 Kb contendo os genes *glnK* e *glnK-His* de *S. mutans* foram ligados ao vetor pTZ18R digerido com as mesmas enzimas. Após a incubação, 1 µL das reações de ligação foi eletroporado na estirpe DH10B de *E. coli* e as colônias transformantes foram selecionadas em meio LA contendo e ampicilina. O DNA plasmidial das colônias obtidas foi isolado, digerido com as enzimas *Xba*I e *Hind*III e então analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% para confirmar a presença do inserto. Os plasmídeos contendo os genes *glnK* e *glnK-His* de *S. mutans* inseridos no vetor pTZ18R foram denominados de pMEGP4 e pMEGP5, respectivamente.

3.2 FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA

A seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da proteína GlnK de *S. mutans* foi obtida através do número de acesso (AN): AAN59296 no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). A análise da seqüência de aminoácidos da proteína GlnK de *S. mutans* foi realizada através do programa Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). A tradução da seqüência de nucleotídeos dos genes *amtB* e *glnK* de *S. mutans* foi realizada pelo programa BioEdit (HALL, 1999). O programa Clustal W (1.82) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) foi utilizado para fazer o alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína GlnK de *S. mutans* com proteínas da família PII de diversos organismos e para a construção do filograma. Os pontos isoelétricos teóricos (pI) foram calculados pelo programa ProtParam (<http://kr.expasy.org/tools/protparam>). O modelo estrutural para o monômero da proteína GlnK de *S. mutans* foi obtido através do programa 3D-JIGSAW (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/>). Os modelos estruturais das proteínas

da família PII de *E. coli* e *S. mutans* foram desenhados através do programa RasMol (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol>).

3.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PROTEÍNA GlnK DE *S. mutans*

3.3.1 Indução da Expressão das Proteínas GlnK e GlnK-His de *S. mutans* UA159 nas estirpes RB9065(λ DE3) e BL21 AI de *E. coli*

Os plasmídeos pMEGP2 e pMEGP3, que contêm o gene *glnK* de *S. mutans* inserido nos vetores pET29a(+) e pET28b(+), respectivamente, foram introduzidos por eletroporação na estirpe de *E. coli* RB9065(λ DE3) para induzir a expressão das proteínas GlnK-Sm e GlnK-His-Sm em grande escala. Três colônias transformantes da estirpe RB9065(λ DE3) com os plasmídeos pMEGP2 ou pMEGP3 foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 0,2% de glutamina, 10 μ g/mL de tetraciclina e 50 μ g/mL de canamicina, e incubadas por 8 horas em agitador rotatório a 200 rpm a 37° C. Estas culturas foram re-inoculadas (diluição 1:100) em 5 L [(RB9065(λ DE3) (pMEGP2)] e 0,5 L [(RB9065(λ DE3) (pMEGP3)] de meio LB, contendo glutamina e os antibióticos, e incubadas a 37° C até atingirem uma absorbância em 600 nm de aproximadamente 0,4. A indução da proteína GlnK-Sm foi feita com 0,5 mmol/L de IPTG (isopropil-tio-galactosídeo) e a cultura foi incubada por 2,5 horas a 37° C. Após indução, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos e ressuspensas em tampão de sonicação (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8, NaCl 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, glicerol 50%). Em seguida, 1 mmol/L de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) foi adicionado e a suspensão de células foi congelada a -70° C.

Para indução da expressão da proteína GlnK-His-Sm na estirpe BL21 AI de *E. coli*, três colônias transformantes contendo o plasmídeo pMEGP3 foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 50 μ g/mL de canamicina e incubadas por 8 horas em agitador rotatório a 200 rpm a 37° C. A cultura foi então re-inoculada em 0,5 L de meio LB contendo 50 μ g/mL de canamicina, e incubada a 37° C até atingir uma absorbância em 600 nm de aproximadamente 1,5. A indução da proteína GlnK-His-

Sm foi feita com 0,2 % de L-arabinose e a cultura foi incubada por 2,5 horas a 37⁰ C. Após indução, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos e ressuspensas em tampão de sonicação (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8, NaCl 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, glicerol 50%). Em seguida, 1 mmol/L de PMSF foi adicionado e a suspensão de células foi congelada a -70⁰ C. A eficiência da indução das proteínas GlnK-Sm e GlnK-His-Sm foi visualizada em SDS-PAGE 15% (LAEMMLI, 1970).

3.3.2 Purificação da Proteína GlnK de *S. mutans* UA159

As células dissolvidas em tampão de sonicação (item 3.3.1) foram incubadas com 50 µg/mL de lisozima em gelo por 30 minutos e sonicadas por 25 segundos 5 vezes com intervalos de 1 minuto. Uma nova alíquota de PMSF 1 mmol/L foi adicionada ao lisado, que foi diluído 5 vezes em tampão de sonicação (item 3.3.1) sem glicerol e tratado com sulfato de estreptomicina 2% (concentração final) para precipitação dos ácidos nucleicos, sob agitação por 30 minutos a 4⁰ C. O lisado tratado foi centrifugado a 15000 rpm, por 30 minutos, e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna Q-Sepharose (Amersham Biosciences), pré-equilibrada com tampão A (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8, NaCl 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, glicerol 10%) e conectada a um sistema FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography, Pharmacia). A amostra foi injetada na coluna com um fluxo de 1mL/minuto. A coluna foi lavada com tampão A (2 mL/minuto) até a estabilização da linha de base e a proteína foi eluída em um gradiente de concentração de NaCl que variou de 50 mmol/L (tampão A) a 1,0 mol/L (tampão B: Tris-HCl 50 mmol/L pH 8, NaCl 1 mol/L, EDTA 1 mmol/L, glicerol 10%). As alíquotas coletadas durante a eluição foram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE) e agrupadas em diferentes frações de acordo com a quantidade e o grau de pureza da proteína.

As frações coletadas foram tratadas com sulfato de amônio 75% p/V sob agitação, por 30 minutos a 4⁰ C e centrifugadas a 18000 rpm por 30 minutos. O precipitado de cada fração foi dissolvido em 200 µL de tampão C (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8, NaCl 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L e glicerol 5%) e aplicado em uma coluna Superdex75 HR10/30 (Amersham Biosciences). A coluna foi pré-equilibrada com tampão C e conectada a um sistema FPLC. O sistema foi operado a um fluxo

de 0,3 mL por minuto. A presença de proteína nas amostras foi verificada por eletroforese (SDS-PAGE) e as alíquotas foram agrupadas em frações de acordo com a quantidade e pureza da proteína. Após a última etapa de purificação, a proteína foi dialisada durante 12 horas contra 0,5 L de tampão D (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8, NaCl 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, glicerol 50%).

Alternativamente, as frações coletadas da coluna Q-Sepharose foram aplicadas em uma coluna Hi-Trap Desalting (Amersham Biosciences), previamente equilibrada com tampão E (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8, NaCl 50 mmol/L e glicerol 10%) para diminuir a concentração de sal presente nas amostras. As frações obtidas nessa etapa foram então aplicadas em uma coluna Hi-Trap Heparin de 5 mL (Amersham Biosciences), previamente equilibrada com tampão E, e conectada a um sistema FPLC operado a um fluxo de 0,3 mL por minuto. A proteína foi eluída em um gradiente de concentração de NaCl que variou de 50 mmol/L (tampão A item 3.3.2) a 1,0 mol/L (tampão B item 3.3.2). A presença de proteína nas amostras foi detectada por eletroforese (SDS-PAGE) e as alíquotas foram agrupadas em frações de acordo com a quantidade e pureza da proteína. Após a última etapa de purificação, a proteína foi dialisada durante 12 horas contra 0,5 mL de tampão D (Tris-HCl 50 mmol/L pH 8, NaCl 50 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, glicerol 50%).

Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4⁰ C e a proteína foi estocada a -20⁰ C.

3.3.3 Purificação da Proteína GlnK-His de *S. mutans* UA159

As células induzidas foram ressuspensas em tampão F (fosfato de sódio 20 mmol/L pH 7,8, NaCl 500mmol/L), com 50 µg/mL de lisozima em gelo e sonificadas (item 3.3.2). Novamente, 1 mmol/L de PMSF foi adicionado ao lisado, que foi incubado com sulfato de estreptomicina 2% (concentração final), sob agitação, por 30 minutos a 4⁰ C. Em seguida, o lisado foi centrifugado a 15000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante aplicado em uma coluna Hi-Trap Chelating-Ni²⁺ de 5 mL (Pharmacia), previamente equilibrada em tampão F, em um sistema FPLC com fluxo de 1 mL/min. A coluna foi lavada com 10 mL de tampão F e a proteína foi eluída em um gradiente de concentração de imidazol de 0 (tampão F) a 1 mol/L (tampão G: fosfato de sódio 20 mmol/L pH 7,8, NaCl 500mmol/L, imidazol 1mol/L). Quinze

alíquotas de 0,6 mL foram coletadas a um fluxo de 1 mL/min. Após a última etapa de purificação, as frações que continham proteína GlnK-Sm foram dialisadas contra 0,5 L de tampão D (item 3.3.2).

Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4^o C e a proteína foi estocada a -20^o C.

3.3.4 Dosagem de Proteínas

A concentração de proteína dos extratos de célula e da proteína purificada foi determinada pelo método de BRADFORD (1976). O padrão de proteína utilizado foi albumina de soro bovino.

3.3.5 Eletroforese de Proteínas Sob Condições Desnaturantes (SDS - PAGE)

As condições de eletroforese desnaturante foram aquelas descritas por LAEMMLI (1970). A concentração do gel separador foi de 15% e foi preparado pela adição de 5 mL de solução estoque de acrilamida (29,2% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida), 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 mol/L (pH 8,8), 300 µL de SDS 10%, 150 µL de persulfato de amônio 10%, 10 µL de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina) e H₂O destilada para um volume final de 10 mL. O gel empilhador continha 0,6 mL de solução estoque de acrilamida, 1 mL de Tris-HCl 0,5 mol/L (pH 6,8), 240 µL de SDS 10%, 75 µL de persulfato de amônio 10%, 4 µL de TEMED e H₂O destilada para um volume final de 4 mL.

O tampão de amostra (Tris-HCl 12 mmol/L (pH 6,8), glicerol 25%, SDS 0,4%, 2-mercaptoetanol 2 mmol/L e azul de bromofenol 0,02%) foi preparado 5 vezes concentrado. As amostras misturadas a este tampão foram aquecidas a 95^o C por 10 minutos e centrifugadas por 2 minutos. As corridas foram realizadas a 180 V por 1 hora em tampão Laemmli (Tris 25 mmol/L, glicina 192 mmol/L e SDS 0,1%, pH 8,3). Este tampão foi preparado 10 vezes concentrado, mantido à temperatura ambiente e diluído no momento do uso. Os géis foram corados com *coomassie blue* R250 0,1% em 10% de ácido acético e 40% de metanol e descorados em solução contendo 10% de ácido acético e 40% de metanol.

3.3.6 Eletroforese nativa em sistema descontínuo

As condições de eletroforese não desnaturante em gel descontínuo foram aquelas descritas por FORCHHAMMER & TANDEAU DE MARSAC (1994). A concentração do gel separador foi de 7,5% e foi preparado pela adição de 3 mL de solução estoque de acrilamida (30% p/V de acrilamida e 0,8% p/V de bis-acrilamida), 3 mL de Tris-HCl 1,5 mol/L (pH 8,9), 3mL de H₂O destilada, 1 mL de Nonidet P-40 0,25%, 100 µL de persulfato de amônio 10% e 10 µL de TEMED. O gel empilhador continha 2 mL de solução estoque de acrilamida (10% de acrilamida e 2,5% de bis-acrilamida), 1mL de Tris-H₃PO₄ 0,5 mol/L (pH 6,9), 4 mL de H₂O destilada, 1 mL de Nonidet P-40 0,25%, 80 µL de persulfato de amônio 10% e 8 µL de TEMED.

O tampão de amostra foi preparado 5 vezes concentrado (Tris-HCl 250 mmol/L (pH 6,8), glicerol 5% e azul de bromofenol 0,02%). As corridas foram feitas a 80 V por 3 a 4 horas em tampão de corrida para proteína nativa (Tris 25 mmol/L e glicina 192 mmol/L) e os géis foram corados com nitrato de prata (COLIGAN *et al.*, 2003).

3.3.7 Determinação da Massa Molecular da Proteína GlnK-His de *S. mutans* UA159

3.3.7.1 Determinação da Massa Molecular da Proteína GlnK-His de *S. mutans* UA159 por gel filtração

A massa molecular da proteína GlnK-His-Sm foi determinada por gel filtração, em uma coluna Superdex 200 HR10/30 (Amersham Biosciences), conectada a um sistema ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences) e previamente equilibrada com tampão H (Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,5, KCl 100 mmol/L) com fluxo de 0,5 mL/min. Uma curva padrão de massa molecular foi obtida utilizando o kit SIGMA (EUA) de marcadores moleculares para proteínas nativas. Após a determinação do volume morto (V_o) da coluna, o volume de eluição (V_e) das proteínas nativas padrão (β -amilase, álcool desidrogenase, albumina de soro bovino, anidrase carbônica e citocromo c) foi utilizado para calcular a razão V_e/V_o para cada proteína. Os valores

das massas moleculares das proteínas foram plotados em função das razões V_e/V_o calculadas, obtendo-se a equação da reta para determinar a massa molecular da proteína GlnK-His-Sm a partir da razão V_e/V_o calculada para essa proteína.

3.3.7.2 Determinação da Massa Molecular da Proteína GlnK-His de *S. mutans* UA159 por Espectrometria de Massa MALDI-ToF

As análises espectrométricas da proteína GlnK-His-Sm foram realizadas em espectrômetro de massa Maldi-Tof Autoflex (Bruker Daltonics). O método de aquisição utilizado foi o modo detector linear para íons com carga positiva. Alíquotas de 2 μ L da proteína e GlnK-His-Sm (4 mg/mL) foram homogeneizadas com 8 μ L da matriz de ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (ácido sinapínico – SA; 5mg/mL) solubilizada em solvente apropriado (30% de acetonitrilo - ACN e 0,1% de ácido trifluoracético - TFA) em eppendorf. Da mistura obtida, foram aplicados 2 μ L à placa para análise por MALDI até a completa secagem das amostras.

3.3.8 Ensaio de Uridililação da Proteína GlnK-His de *S. mutans* UA159

O efeito da proteína GlnD de *E. coli* sobre a proteína GlnK-His-Sm foi avaliado em ensaios de uridililação *in vitro*. As proteínas purificadas GlnD de *E. coli* e GlnB de *H. seropedicae*, utilizadas como controle, foram gentilmente cedidas por Benelli, E. M. e Bonatto, A. C. respectivamente. A proteína GlnD de *E. coli* foi purificada como descrito por KAMBEROV *et al.* (1994). A proteína GlnB de *H. seropedicae* foi purificada como descrito por BENELLI *et al.* (2001). O sistema de reação continha 2 μ mol/L das proteínas GlnK-His-Sm, ou GlnB de *H. seropedicae* purificadas, 0,1 μ mol/L da proteína GlnD de *E. coli*, 1mmol/L de UTP, 1 mmol/L de ATP, 10 mmol/L de 2-oxoglutarato, 6 μ L de tampão de uridililação (Tris-HCl 50 mmol/L (pH 7,6), KCl 100 mmol/L e MgCl₂ 10 mmol/L) e H₂O destilada para um volume final de 30 μ L. As reações foram incubadas a 30° C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado tampão de amostra não desnaturante, e o volume total de cada reação foi aplicado em gel de acrilamida não desnaturante descontínuo.

3.4 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA GlnK DE *S. mutans* UA159 EM *E. coli*

3.4.1 Obtenção dos Transconjugantes Para os Ensaio de β -Galactosidase

O plasmídeo pCC46 (CONTRERAS & DRUMMOND, 1991), que contém o operon *nifLA* de *K. pneumoniae* expresso a partir do promotor *lac*, foi introduzido por eletroporação nas estirpes de *E. coli* YMC10 (selvagem), UNF3435 (*glnB⁻ glnK⁻*) e NCM1686 (*glnD⁻*), (HE *et al.*, 1997; ARCONDÉGUY *et al.*, 1999). Em seguida, os plasmídeos pMEGP4 (*glnK* de *S. mutans*), pMEGP5 (*glnK-His* de *S. mutans*), pDK601 (*glnB* de *E. coli*), pWVH149 (*glnK* de *E. coli*) e o vetor pTZ18R foram introduzidos em cada uma das estirpes transformantes por eletroporação.

3.4.2 Ensaio de β -Galactosidase

As estirpes descritas no item 3.4.1 foram crescidas em meio LB por 12 horas a 37⁰ C. Após serem inoculadas em meio NFDM modificado (item 3.1.2) foram mantidas no agitador a 30⁰ C até atingirem uma absorbância em 600 nm de 0,6 a 0,8. As culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 1 minuto e ressuspensas em meio NFDM (item 3.1.2) com 10 μ mol/L de IPTG, e diluídas para uma absorbância de 0,05 em um volume final de 2 mL em frascos de 5 mL. Os frascos foram fechados com rolhas de borracha (*suba-seals*) e o ar contido no interior dos frascos foi substituído por argônio. As culturas foram crescidas com ou sem 20 mmol/L de NH₄Cl, em condições de anaerobiose por 16 horas a 30⁰ C, em agitador rotatório a 120 rpm.

A atividade de β -galactosidase foi determinada em placas de 96 poços de acordo com o método descrito por SCHWAB (2002). Alíquotas de 20 μ L das culturas de *E. coli* foram transferidas para um poço da placa e foram adicionados 380 μ L de tampão Z (Na₂HPO₄.7H₂O 60 mmol/L, Na₂HPO₄.7H₂O 40 mmol/L, KCL 10 mmol/L, MgSO₄.7H₂O 1 mmol/L, β -mercaptoetanol 50 mmol/L, pH 7,0 e SDS 0,0027%) e 20 μ L de clorofórmio ao sistema. A mistura foi homogeneizada em agitador vórtex por 20 segundos, centrifugada a 4000 rpm por 10 segundos e incubada a 30⁰ C por 10

minutos. A reação foi iniciada pela adição de 80 μL de uma solução 4 mg/mL de o-nitrofenol- β -D-galactosídeo (ONPG) e incubada a 30^o C por diferentes tempos dependendo da estirpe de *E. coli* utilizada no ensaio. Em seguida, as reações foram interrompidas pela adição de 200 μL de Na_2CO_3 1mol/L. A mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos e 200 μL do sobrenadante foram cuidadosamente transferidos para uma placa de ELISA. A absorbância das reações foi determinada a 415 nm e a absorbância das culturas foi determinada a 595 nm. O cálculo de atividade foi feito utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Unidade Miller} = 1000 \times \text{DO}_{415} / (\text{T} \times \text{V} \times \text{DO}_{595})$$

Onde:

DO_{415} é determinada da mistura de reação,

DO_{595} é a absorbância da cultura em 595 nm,

T é o tempo da reação,

V é o volume de cultura utilizado no ensaio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GlnK DE *S. mutans*

Em *S. mutans*, uma única proteína do tipo PII foi identificada (número de acesso no GenBank: AAN59296) e localiza-se entre duas ORF's, uma com alta homologia com o gene *amtB* de *Bacillus subtilis* à montante, e outra com o gene *serC* (número de acesso no GenBank: AAN59295), à jusante (AJDIC *et al.*, 2002). A proteína AmtB de *S. mutans* (número de acesso no GenBank: AAN59551.1) apresenta 47% de identidade e 82% de similaridade com a proteína AmtB de *B. subtilis* (número de acesso no GenBank: CAB15668.1) e 42% de identidade e 60% de similaridade com a proteína AmtB de *E. coli* (número de acesso no GenBank: AAC73554). O gene *serC* codifica para uma fosfoserina aminotransferase, envolvida com o metabolismo dos aminoácidos Gly, Ser e Thr, e com o metabolismo da vitamina B6. Em *S. mutans*, a proteína da família PII identificada contém 113 resíduos de aminoácidos e não possui sítios de uridililação ou fosforilação conservados. O resíduo de Tyr51 é substituído por um resíduo de Ile, e o resíduo de Ser49 é substituído por um de Gln, o que pode conferir características diferentes no controle do metabolismo do nitrogênio neste organismo.

O alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína do tipo PII de *S. mutans* com as proteínas do tipo PII de outros organismos foi realizado utilizando o Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Os resultados mostraram que aquela proteína apresenta maior homologia com as proteínas GlnK de *S. thermophilus*, *L. lactis* e *Synechococcus* sp. do que com as proteínas GlnK de *B. subtilis*, *E. coli* ou *K. pneumoniae* (Tabela 3). O filograma produzido pelo programa Clustal W (1.82) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) (Figura 3) mostra que a proteína do tipo PII de *S. mutans* é filogeneticamente mais próxima das proteínas do tipo PII de organismos gram-positivos (proteínas GlnK de *S. thermophilus*, *L. lactis* e *B. subtilis*), de archaea, (proteínas GlnK de *M. mazei* e *M. maripaludis*), e de cianobactérias (proteína GlnK). Assim, devido à sua organização genômica e aos resultados obtidos pelo filograma, a proteína da família PII de *S. mutans* foi denominada de GlnK.

O grau de identidade entre a proteína GlnK de *S. mutans* e as proteínas do tipo PII de diazotrofos gram-negativos, como *H. seropedicae* e *A. brasilense*, e de bactérias entéricas, como *E. coli* e *K. pneumoniae*, é baixo (Tabela 3). Estas proteínas também estão filogeneticamente mais distantes da proteína GlnK de *S. mutans* (Figura 3).

Devido à proximidade filogenética das proteínas GlnK de *S. mutans* e GlnK de *Synechococcus* sp., e ao grau de identidade (58%) e similaridade (75%) entre as mesmas, é possível que em *S. mutans*, à semelhança de *Synechococcus* sp, o metabolismo do amônio e dióxido de carbono estejam interligados via GlnK. A relação entre o metabolismo do dióxido de carbono e o metabolismo do amônio nos estreptococos orais já foi descrita (YAMADA & CARLSSON, 1973).

A análise da sequência de nucleotídeos da região intergênica entre *amtB* e *glnK* de *S. mutans* mostrou que não há terminadores de transcrição nesta região, sugerindo que *amtB* e *glnK* formem um operon neste organismo. A sequência TTGAAAT-N₁₇-TACTAT, localizada a 151 pb a montante do início de tradução da proteína AmtB, é homóloga à sequência consenso TTGACA-N₁₇-TATAAT reconhecida por promotores dependentes de σ^A , que são semelhantes aos do tipo σ^{70} (Figura 4) (CAMACHO & SALAS, 1999). Além disso, uma provável região de ligação da proteína GlnR foi identificada a 38 pb a montante do início de tradução de AmtB. Esta sequência é homóloga à sequência consenso TGTNAN₇TNACA reconhecida por proteínas GlnR, que regulam a expressão do operon *amtBglnKglnD* em alguns organismos (GUTOWSKI & SCHREIER, 1992; BROWN & SONENSHEIN, 1996; FINK *et al.*, 2002). Um provável terminador de transcrição do tipo rho-independente foi identificado a 96 pb a jusante do códon de terminação da proteína GlnK (Figura 4) (FARNHAM & PLATT, 1981).

Embora *S. mutans* possua os genes *glnRA*, *gltAB* e *codY*, à semelhança do observado em *B. subtilis*, as análises realizadas neste trabalho não mostraram a existência de genes semelhantes ao *tnrA* ou ao *amtR*. Genes semelhantes ao *ntrB*, *ntrC* e *glnD* também não foram identificados em *S. mutans*.

Os alinhamentos das proteínas do tipo PII de diferentes organismos mostram que os sítios de uridililação ou fosforilação nem sempre são conservados, mas os sítios de ligação para ATP (XU, *et al.*, 1998; XU, *et al.*, 2001) e o provável sítio de ligação para o 2-oxoglutarato (BENELLI, *et al.*, 2002) são conservados entre eles

(Figuras 5 e 6). Estes dados sugerem que provavelmente, os efetores ATP e 2-oxoglutarato sejam essenciais para as funções sinalizadoras das proteínas do tipo PII e que as modificações pós-traducionais podem contribuir para refinar o sistema de controle dessas proteínas para a adaptação do organismo a seu habitat.

TABELA 3 - IDENTIDADE E SIMILARIDADE DA PROTEÍNA GlnK DE *S. mutans* COM PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII DE DIFERENTES ORGANISMOS

Continua

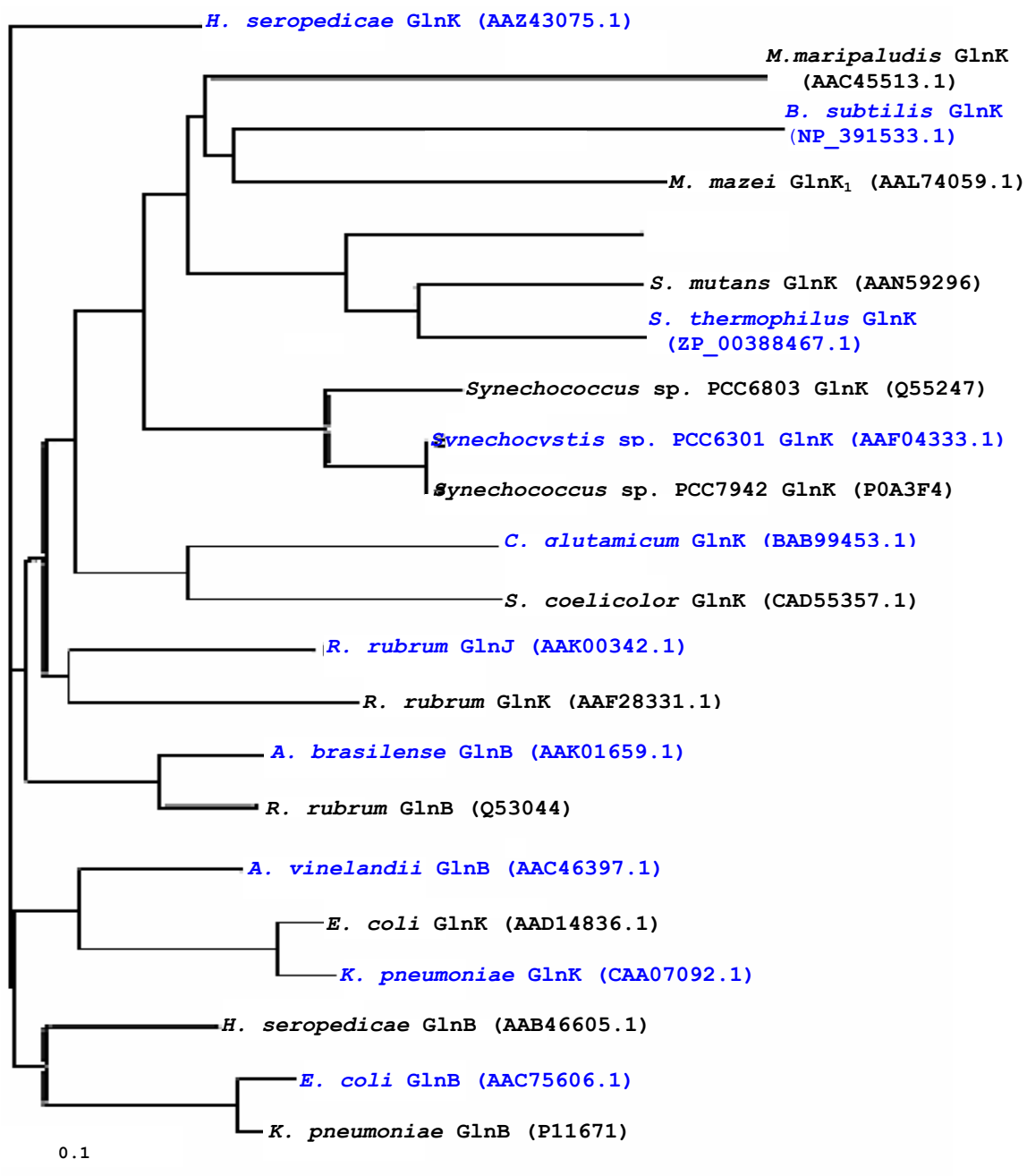
ORGANISMO	PROTEÍNA	IDENTIDADE	SIMILARIDADE
<i>S. thermophilus</i>	GlnK (ZP_00388467.1)	72 %	83 %
<i>L. lactis</i>	GlnK (NP_267747.1)	61 %	82 %
<i>Synechococcus</i> sp. PCC6301	GlnK (AAF04333.1)	58 %	75 %
<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	GlnK (P0A3F4)	58 %	75 %
<i>A. brasilense</i>	GlnB (AAK01659.1)	55 %	73 %
<i>K. pneumoniae</i>	GlnB (P11671)	55 %	73 %
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	GlnK (Q55247)	53 %	74 %
<i>R. rubrum</i>	GlnB (Q53044)	53 %	71 %
<i>A. fulgidus</i>	GlnB ₂ (AAB89507.1)	53 %	69 %
<i>M. maripaludis</i>	GlnK ₁ (CAF29620.1)	50 %	69 %
<i>E. coli</i>	GlnB (AAC75606.1)	50 %	69 %
<i>Azoarcus</i> sp.	GlnB (CAI10124.1)	49 %	73 %
<i>M. mazei</i>	GlnB _i (AAM30654.1)	49 %	67 %
<i>A. fulgidus</i>	GlnB ₁ (AAB90263.1)	46 %	69 %
<i>A. fulgidus</i>	GlnB ₃ (AAB89500.1)	45 %	69 %
<i>A. brasilense</i>	GlnZ (CAA63238.1)	45 %	67 %
<i>M. maripaludis</i>	GlnK ₂ (CAF29623.1)	45 %	66 %
<i>H. seropedicae</i>	GlnB (AAB46605.1)	44 %	70 %
<i>C. glutamicum</i>	GlnK (BAB99453.1)	44 %	69 %
<i>R. rubrum</i>	GlnJ (AAK00342.1)	44 %	66 %
<i>R. rubrum</i>	GlnK (AAF28331.1)	44 %	62 %

TABELA 3 - IDENTIDADE E SIMILARIDADE DA PROTEÍNA GlnK DE *S. mutans* COM PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII DE DIFERENTES ORGANISMOS

ORGANISMO	PROTEÍNA	IDENTIDADE	Conclusão
			SIMILARIDADE
<i>Azoarcus</i> sp.	GlnY (Q9EZQ4)	43 %	64 %
<i>Azoarcus</i> sp.	GlnK (CAI07894.1)	42 %	66 %
<i>K. pneumoniae</i>	GlnK (CAA07092.1)	41 %	67 %
<i>E. coli</i> .	GlnK (AAD14836.1)	41 %	66 %
<i>S. coelicolor</i>	GlnK (CAD55357.1)	40 %	69 %
<i>M. mazei</i>	GlnK ₁ (AAL74059.1)	40 %	58 %
<i>M. maripaludis</i>	Nifl ₁ (CAF30410.1)	40 %	57 %
<i>M. maripaludis</i>	GlnB _i (AAC45513.1)	38 %	55 %
<i>B. subtilis</i>	GlnK (NP_391533.1)	37 %	55 %
<i>M. mazei</i>	GlnK ₂ (AAK33114.1)	36 %	53 %
<i>M. mazei</i>	Nifl ₂ (AAM30417.1)	35 %	53 %
<i>M. mazei</i>	Nifl ₁ (AAM30416.1)	34 %	54 %
<i>M. maripaludis</i>	Nifl ₂ (CAF30411.1)	33 %	50 %

A análise da sequência de aminoácidos das proteínas GlnK-Sm e das proteínas do tipo PII de diferentes organismos foi realizada através do programa Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). O número de acesso no GenBank está indicado entre parênteses.

FIGURA 3 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DA PROTEÍNA GlnK DE *S. mutans* E PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII DE DIVERSOS ORGANISMOS



A árvore filogenética foi calculada pelo programa Clustal W (1.82) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). O número de acesso no GenBank de cada seqüência está indicado entre parênteses.

FIGURA 4 – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS DOS GENES *amtB* E *glnK* DE *S. mutans* COM SUAS PROVÁVEIS REGIÕES REGULADORAS DE TRANSCRIÇÃO

cta aaa acg aaa agc tta act tat ctt tag gac gta ctt atc aaa																
aag ctt aaa tct ctc ttt gag cag caa tat taa tag caa aga cag																
cga aaa aga taa atg gtc act gga aat <u>agt tga aat</u> aag ctt tag																
agc cct <u>agt act ata</u> ata ttt tca aat aat ata aga tgt tat att																
ctc tga att ttt aga aaa ttt cgc caa aaa atc ttt tat ttt cct																
gaa aat atg tta tat tat ata aca taa agg gag gtg ctg ata gat																
RBS																
1	<u>atg</u> gat tca gga tct ata gca ttt att atc att tgt tct gcg ctt															45
1	M	D	S	G	S	I	A	F	I	I	I	C	S	A	L	15
46	gtt ttt tta atg aca ccg ggt tta gcc ttt ttc tat gga ggc ttg															90
16	V	F	L	M	T	P	G	L	A	F	F	Y	G	G	L	30
91	gga cgc cgc aag aat gtc atc aat aca atg atg atg gca gtt gtg															135
31	G	R	R	K	N	V	I	N	T	M	M	M	A	V	V	45
136	cca ctt gct ttg gcc tcg ctt ttg tgg gta gtt gta ggt tat tcc															180
46	P	L	A	L	A	S	L	L	W	V	V	V	G	Y	S	60
181	tta tct ttt agt ggt gtt gga aaa gta ttt ggt gat ttt tca cat															225
61	L	S	F	S	G	V	G	K	V	F	G	D	F	S	H	75
226	gtc ttt ttg aat ggt gtg aag gaa gga gca agt agt aga ggg tta															270
76	V	F	L	N	G	V	K	E	G	A	S	S	R	G	L	90
271	aca ata cca gat acc tta ttt tct ggt ttt caa atg atg ttt tct															315
91	T	I	P	D	T	L	F	S	G	F	Q	M	M	F	S	105
316	atc att aca gta gct att ttg aca ggt gct gtt gca gga agg atg															360

106 I I T V A I L T G A V A G R M 120
 361 cgt ttc act cct tta gtt att ttt att atc ttt tgg tta ctt tta 405
 121 R F T P L V I F I I F W L L L 135

 406 gtc tat tat cct ttt gca cac atg gtt tgg gat gat ggt cta tta 450
 136 V Y Y P F A H M V W D D G L L 150

 451 gca aaa tgg ggg acg ctt gat ttt gcc ggt ggt gat gtt gtc cac 495
 151 A K W G T L D F A G G D V V H 165

 496 att aca tca ggc gtt tcg ggg ctg gta tta gcc ttg gta gtc ggt 540
 166 I T S G V S G L V L A L V V G 180

 541 aaa cgt cgc gat tat gac cgt ctg gaa tat cgt cca cat aat att 585
 181 K R R D Y D R L E Y R P H N I 195

 586 ccc ttt gtt ctt ttg gga gca ggc cta ctc tgg ttt ggt tgg ttt 630
 196 P F V L L G A G L L W F G W F 210

 631 ggg ttt aat gca ggt tcc gct tta gct gct aat ggt ttg gct gtt 675
 211 G F N A G S A L A A N G L A V 225

 676 cat gct ttg ttg aca act cat att tca gct gcc gct gct atg ttc 720
 226 H A L L T T H I S A A A A M F 240

 721 tca tgg ctg cta ctt gaa aaa tat tta aat ggt aaa cct tcc tta 765
 241 S W L L L E K Y L N G K P S L 255

 766 gta ggc ggt tca act ggt tta gtc gca ggc tta gtt gcc att aca 810
 256 V G G S T G L V A G L V A I T 270

 811 cca ggt gca ggc ttt gta ccc tta tgg agc tct ttg ttg ata gga 855
 271 P G A G F V P L W S S L L I G 285

 856 ctc atg gtt agt cct cta tgt tat ttt gct atc gct gtg ttg aaa 900
 286 L M V S P L C Y F A I A V L K 300

901 agt aaa ttt ggt tat gat gat gcc ttg gat gct ttt ggc tgt cat 945
 301 S K F G Y D D A L D A F G C H 315

946 ggt ata ggt ggt att ttc gga ggg att gta aca gga ctt ttt aca 990
 316 G I G G I F G G I V T G L F T 330

991 aca cct cat ctg gct tta gat aaa tcc aat att ggt ctt att tat 1035
 331 T P H L A L D K S N I G L I Y 345

1036 ggt aat gca aga tta ttt tta gtt att ctg gca gct att ctt ttt 1080
 346 G N A R L F L V I L A A I L F 360

1081 acg att att tgg tca gct ctg att agt ttt tta att ata aaa gtt 1125
 361 T I I W S A L I S F L I I K V 375

1126 att tcc ctt ttc atg cca att cgt gtc agt gat aga gaa gaa gct 1170
 376 I S L F M P I R V S D R E E A 390

1171 act gga ctt gac gac aaa gag cat gga gaa act gcg tat cca acc 1215
 391 T G L D D K E H G E T A Y P T 405

1216 ttt atg gga ctt gat tct tag gag aaa gga agt atc atg aaa aaa 1260
 406 F M G L D S * RBS M K K 420

1261 ata gaa gct att att cgc tct gat aaa tta gaa gat tta aaa gca 1305
 421 I E A I I R S D K L E D L K A 435

1306 gcc ttg gtt cag tca ggt ttt atc aaa gga atg act att agc caa 1350
 436 A L V Q S G F I K G M T I S Q 450

1351 gtt cta gga ttt ggg aat caa cga ggt tat aca gaa tat gtc cgt 1395
 451 V L G F G N Q R G Y T E Y V R 465

1396 ggt caa aag atc act cca acg ctc tta gcc aaa gtg aaa gtt gaa 1440

```

466  G   Q   K   I   T   P   T   L   L   A   K   V   K   V   E   480
1441 att gtt gct cat gat gca gca gtc gaa gaa atg att acg acc atc 1485
481  I   V   A   H   D   A   A   V   E   E   M   I   T   T   I   495

1486 agc caa gca gta aag aca gga gaa gtt ggt gat ggt aag ata ttt 1530
496  S   Q   A   V   K   T   G   E   V   G   D   G   K   I   F   510

1531 gtc agt cca gtt gat gaa att gtt aga att cgt aca gga gaa cgt 1551
511  V   S   P   V   D   E   I   V   R   I   R   T   G   E   R   525

1552 gat ggt gat gcc att taa gtt gcc tgt ctt tgc tat taa tat tgc 1596
526  D   G   D   A   I   *                               530

1597 tgc tca aag aga gat tta agc ttt ttg ata agt agc tcc taa aga 1641
1642 taa gtt aag ctt ttc gtt ttt agg atg tgc ttt ttt tga aaa aca 1686
1687 aat ttt tga gga tga atg aaa tta gtt tac aaa att ctg aaa att 1731
1732 tgt gat ata att tac 1746

```

A tradução da seqüência de nucleotídeos dos genes *amtB* e *glnK* de *S. mutans* foi realizada pelo programa BioEdit (HALL, 1999) e está representada em código de letra abaixo do códon correspondente:

Região sublinhada: provável promotor dependente de σ^A (TTGAAAT-N₁₇-TACTAT) (CAMACHO & SALAS, 1999);

Retângulo verde: provável região de ligação da proteína GlnR (TGTNAN₇TNACA) (GUTOWSKI & SCHREIER, 1992; BROWN & SONENSHEIN, 1996);

Retângulo vermelho: prováveis sítios de ligação para ribossomo (RBS);

Azul: gene *amtB* de *S. mutans*;

Magenta: gene *glnK* de *S. mutans*;

Retângulo preto: prováveis códons de início de tradução;

Asterisco (*): códons de término de transcrição;

Negrito: provável terminador de transcrição do tipo rho-independente (FARNHAM & PLATT, 1981).

FIGURA 5 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GlnK DE *S. mutans* COM PROTEÍNAS GlnK DE DIFERENTES ORGANISMOS

	10	20	30	40	50
<i>S. thermophilus</i> GlnK	-----MKKI	EAIIRSDKLE	DLKNTLTGSG	LTKGMTVSQV	LGHGTQRGFA
<i>L. lactis</i> GlnK	-----MKKI	EAIIRTDKLE	DLKAALSDNG	LVHGMTVSQV	LGYPEQKGFT
<i>Syn PCC6301</i> GlnK	-----MKKI	EAIIRPFKLD	EVKIALVNAG	IV-GMTVSEV	RGFGRQKGQT
<i>Syn PCC7942</i> GlnK	-----MKKI	EAIIRPFKLD	EVKIALVNAG	IV-GMTVSEV	RGFGRQKGQT
<i>Syn PCC6803</i> GlnK	-----MKKV	EAIIRPFKLD	EVKIALVNAG	IV-GMTVSEV	RGFGRQKGQT
<i>M. mazei</i> GlnK1	-----MKYV	IAMIRPERLD	AVKRELQKIE	VS-RLTVSSV	SGYGAQKGYM
<i>M. maripaludis</i> GlnK2	-----MKKL	EAIIRMERVG	LVKNALYKSG	HA-SLTLTEV	KGRGVQGGIV
<i>R. rubrum</i> GlnK	-----MKLI	MAIKPFKLD	EVCEALTSLD	VH-GLTVSEV	KGFGRQKGQT
<i>Azoarcus</i> GlnK	-----MKFV	TAIKPFKLD	EVREALSAIG	VQ-GITVTEV	KGFGRQKGHT
<i>K. pneumoniae</i> GlnK	-----MKLV	TVVIKPFKLE	DVRERLSSMG	IQ-GLTVTEV	KGFGRQKGHA
<i>E. coli</i> GlnK	-----MKLV	TVIIPFKLE	DVREALSSIG	IQ-GLTVTEV	KGFGRQKGHA
<i>S. coelicolors</i> GlnK	-----MKLI	TAVVKPHRLD	EIKEALQAFG	VH-GLTVTEA	SGYGRQRGHT
<i>B. subtilis</i> GlnK	--MSGQMFV	EIVTRPANFE	KLKQELGKIG	VT-SLTFSNV	HGCGLQKAHT
<i>M. mazei</i> GlnK2	MSSEGDFLLV	VTIVKKGWGD	EVVKASRKAG	AQ-GGTILYG	RGTGIHENKS
<i>C. glutamicum</i> GlnK	-----MKLI	TAIVKPFILT	DIKDALEQAG	VQ-GMTVTET	QGFGRQKGHT
<i>A. vinelandii</i> GlnK	-----MKLV	TAIKPFKLD	DVRESLSEIG	VQ-GITVTEV	KGFGRQKGHT
<i>M. maripaludis</i> GlnK1	-----MKKI	EAIIRIERLD	IVKGILSENG	FL-SLTISEV	KGRGVQGGIT
<i>S. mutans</i> GlnK	-----MKKI	EAIIRSDKLE	DLKAALVQSG	FIKGMTISQV	LGFGNQRGYT
	:	:	:	*	* * :
	60	70	80	90	100
<i>S. thermophilus</i> GlnK	EFVRGQRIVP	TLLAKVKVEI	VVKDLAVDEV	VDTIRSAVA-	-TGEVGDGKI
<i>L. lactis</i> GlnK	EYVRGQRIET	TLLSKLKIEI	VSIDEKVDDI	VNVIIKAVQ-	-TGEVGDGKI
<i>Syn PCC6301</i> GlnK	ERYRGSEYTV	EFLQKLKLEI	VVEDAQVDTV	IDKIVAAAR-	-TGEIGDGKI
<i>Syn PCC7942</i> GlnK	ERYRGSEYTV	EFLQKLKLEI	VVEDAQVDTV	IDKIVAAAR-	-TGEIGDGKI
<i>Syn PCC6803</i> GlnK	ERYRGSEYTV	EFLQKLKIEI	VVDEGQVDMV	VDKLVSAAR-	-TGEIGDGKI
<i>M. mazei</i> GlnK1	EIYRAMEYDA	NLLEKIKIEI	AVNDEFLEPT	IEAIKTGAKG	SDGYVGSGLI
<i>M. maripaludis</i> GlnK2	ERYRGTEHV	DLLPKVKIEL	VVNEKDVS	IKIIAENAY-	-TGKPGDGKI
<i>R. rubrum</i> GlnK	EIYRGAEYQV	NFLPKVKIEV	AVSDGLADLA	VEAICNAAR-	-TDRIGDGKV
<i>Azoarcus</i> GlnK	ELYRGAEYVV	DFLPKVKIEA	AIRPDLLDQA	IEAIEKSAA-	-TGKIGDGKI
<i>K. pneumoniae</i> GlnK	ELYRGAEYSV	NFLPKVKIDV	AIADDQLDEV	VDVISKAAY-	-TGKIGDGKI
<i>E. coli</i> GlnK	ELYRGAEYSV	NFLPKVKIDV	AIADDQLDEV	IDIVSKAAY-	-TGKIGDGKI
<i>S. coelicolors</i> GlnK	EVYRGAEYTV	DLVPKIRIEV	LVEDDDAEQL	IDVVVKAAR-	-TGKIGDGKV
<i>B. subtilis</i> GlnK	ELYRGVKIES	NVYERLKIEI	VVSKVPVDQV	TETAKRVLK-	-TGSPGDGKI
<i>M. mazei</i> GlnK2	ILGLMIEPEK	EIVLTITESC	IADN-----I	LKSITEAVK-	-LDEPSTGVG
<i>C. glutamicum</i> GlnK	EVYRGAEYAV	DFVPVKIEV	IISDAQAEV	INIIVETAR-	-TGKVGDGKV
<i>A. vinelandii</i> GlnK	ELYRGAEYVV	DFLPKVKIDV	AIEDSQLDHV	IEAITKAAN-	-TGKIGDGKI
<i>M. maripaludis</i> GlnK1	ERYRGTEYVV	DLLPKVKLEM	VVDDKDIDEV	ITIIIRENAE-	-TGKPGDGKI
<i>S. mutans</i> GlnK	EYVRGQKITP	TLLAKVKVEI	VAHDAAVEEM	ITTISQAVK-	-TGEVGDGKI
	.	.	:	.	* *

	110	120	128
<i>S. thermophilus</i> GlnK	FIVPIDDVIR IR-----TGE	RGGDAI--	
<i>L. lactis</i> GlnK	FIQPVERVIR IR-----TSE	EDAQAL--	
<i>Syn PCC6301</i> GlnK	FVSPVDQTI R IR-----TGE	KNADAI--	
<i>Syn PCC7942</i> GlnK	FVSPVDQTI R IR-----TGE	KNADAI--	
<i>Syn PCC6803</i> GlnK	FISPVDSVVR IR-----TGE	KDTEAI--	
<i>M. mazei</i> GlnK1	FVLPLENVIR IR-----TNE	TGPEAI--	
<i>M. maripaludis</i> GlnK2	FVIPVEDVCR VR-----TGE	MGPDAI--	
<i>R. rubrum</i> GlnK	FVYDLDKIVR IR-----TGE	IDADAL--	
<i>Azoarcus</i> GlnK	FVFDLEQAIR IR-----TGE	TGPDAL--	
<i>K. pneumoniae</i> GlnK	FVAELQRVIR IR-----TGE	SDEAAL--	
<i>E. coli</i> GlnK	FVAELQRVIR IR-----TGE	ADEAAL--	
<i>S. coelicolors</i> GlnK	WAVPVDTAVR VR-----TGE	RGPDAL--	
<i>B. subtilis</i> GlnK	FVYEISNTIN IR-----TGE	EGPEAL--	
<i>M. mazei</i> GlnK2	FIVPLEKVFG ITRYFCMQD	RSQKSSGS	
<i>C. glutamicum</i> GlnK	WMTNIEELVR VR-----TGE	RGEAAL--	
<i>A. vinelandii</i> GlnK	FVVNLEQAIR IR-----TGE	TGTDAL--	
<i>M. maripaludis</i> GlnK1	FIIPVEDAVR IR-----TGE	SGIKAI--	
<i>S. mutans</i> GlnK	FVSPVDEIVR IR-----TGE	RDGDAI--	
	: :. :	: . :	

O alinhamento das proteínas GlnK de diversos organismos foi realizado através do programa Clustal W (1.82) (www.ebi.ac.uk/clustalw):

Resíduos sublinhados: motivo Walker A (GXXXXGKS); **verde**: sítio de uridililação; **amarelo**: sítio de fosforilação; **vermelho**: resíduos que interagem com o grupamento fosfato do ATP (XU, *et al.*, 2001); **azul**: resíduos que interagem com a base e/ou com o açúcar do ATP (XU, *et al.*, 1998); * : aminoácido conservado; : : substituição conservativa; . : substituição semiconservativa.

FIGURA 6 - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA GlnK DE *S. mutans* COM PROTEÍNAS GlnB DE DIFERENTES ORGANISMOS

	10	20	30	40	50
<i>A. brasilense</i> GlnB	-----	-MKKIEAIIK	PFKLDEVKEA	LHEVGIK-GI	TVTEAKG F GR
<i>K. pneumoniae</i> GlnB	-----	-MKKIDAIK	PFKLDDVREA	LAEVGIT-GM	TVTEVKG F GR
<i>R. rubrum</i> GlnB	-----	-MKKIEAIIK	PFKLDEVKEA	LHEIGLQ-GI	TVTEAKG F GR
<i>A. fulgidus</i> GlnB2	-----	-MKKIEAIVR	AEKFPEVKAA	LEERGFY-GM	TVTDVKGRGQ
<i>E. coli</i> GlnB	-----	-MKKIDAIK	PFKLDDVRER	LAEVGIT-GM	TVTEVKG F GR
<i>Azoarcus</i> sp. GlnB	-----	-MKKIEAVIK	PFKLDEVREA	LSEVGIA-GL	TVSEVKG F GR
<i>A. fulgidus</i> GlnB1	MRRLPTREVV	EMKMVAVIR	PEKLECVKKA	LEERGFV-GM	TVTEVKGRGE
<i>A. fulgidus</i> GlnB3	MRRLPTREVV	DMKMVAVIR	PEKLECVKKA	LEERGFV-GM	TVTEVKGRGE
<i>H. seropedicae</i> GlnB	-----	-MKQVTAIIK	PFKLDEVRES	LAEVGVT-GL	TVTEVKG F GR
<i>M. mazei</i> GlnB	-----MV	AMKYVIAMIR	PERLDAVKRE	LQKIEVS-RL	TVSSVSGYGA
<i>S. mutans</i> GlnK	-----	-MKKIEAIIR	SDKLEDLKAA	LVQSGFIKGM	TISQVLGFNG
		** :	*:::	. ::	:: * : . : *::.. * *
	60	70	80	90	100
<i>A. brasilense</i> GlnB	QKGHTELYRG	AEYVDFLPK	VKIEVVMEDS	LVERAIEAIQ	QAA--HTGRI
<i>K. pneumoniae</i> GlnB	QKGHTELYRG	AEYMDFLPK	VKIEIVTDD	IVDTCVDTH	RTA--QTGKI
<i>R. rubrum</i> GlnB	QKGHTELYRG	AEYVDFLPK	VKIELVIEDA	LVERAIEAIQ	QAA--QTGRI
<i>A. fulgidus</i> GlnB2	QGGMQIQFRG	RTMEVTLTPK	VKLEIVVKDD	AVEEVIGLIV	NSA--FTGSP
<i>E. coli</i> GlnB	QKGHTELYRG	AEYMDFLPK	VKIEIVPDD	IVDTCVDTH	RT---ETGKI
<i>Azoarcus</i> sp. GlnB	QKGHTELYRG	AEYVDFLPK	IKVEIVLGDD	LVDQAVEAII	KAA--RTGKI
<i>A. fulgidus</i> GlnB1	QKGIRLQFRG	REVEVDLLQK	TKVEVVVSDD	AVDEVVEAIV	SSA--RTGKF
<i>A. fulgidus</i> GlnB3	QKGIRLQFRG	REVEVDLLQK	TKVEVVVSDD	AVDEVVEAIV	SSA--RTGKF
<i>H. seropedicae</i> GlnB	QKGHTELYRG	AEYVDFLPK	VKIEVVVDDK	VVEQAVDAII	KAA--RTGKI
<i>M. mazei</i> GlnB	QKGYMEIYRA	MEYDANLLEK	IKIEIAVNDE	FLEPTIEAIK	TGAKGSDGYV
<i>S. mutans</i> GlnK	QRGYTEYVRG	QKITPTLLAK	VKVEIVAHDA	AVEEMITTIS	QAV--KTGEV
	* *	*.	: * *	*:::	* : : *
	110	120	126		
<i>A. brasilense</i> GlnB	GDGKIFVTPV	ERIVR I RTGE	KGGDAI		
<i>K. pneumoniae</i> GlnB	GDGKIFVFDV	ARVIR I RTGE	EDDAAI		
<i>R. rubrum</i> GlnB	GDGKIFVYAI	EEAIR I RTGE	RGGDAI		
<i>A. fulgidus</i> GlnB2	GDGKIFIIPV	EDVVR I RTGE	RGDDSL		
<i>E. coli</i> GlnB	GDGKIFVFDV	ARVIR I RTGE	EDDAAI		
<i>Azoarcus</i> sp. GlnB	GDGKIFVTAV	EQVVR I RTGE	TDEAAI		
<i>A. fulgidus</i> GlnB1	GDGRIFVIPV	EKSVK I RTGE	--EEV-		
<i>A. fulgidus</i> GlnB3	GDGRIFVIPV	EKSVK I RTGD	--EEV-		
<i>H. seropedicae</i> GlnB	GDGKIFVQEV	EQVIR I RTGE	TGPDAV		
<i>M. mazei</i> GlnB	GSGKIFVLPL	ENVIR I RTNE	TGPEAI		
<i>S. mutans</i> GlnK	GDGKIFVSPV	DEIVR I RTGE	RDGDAI		
	.:::	:	::		

O alinhamento das proteínas GlnK-Sm com proteínas GlnB de diversos organismos foi realizado através do programa Clustal W (1.82) (www.ebi.ac.uk/clustalw/):

Resíduos sublinhados: motivo Walker A (GXXXXGKS); **verde**: sítio de uridilação; **vermelho**: resíduos que interagem com o grupamento fosfato do ATP (XU, *et al.*, 2001); **azul**: resíduos que interagem com a base e/ou com o açúcar do ATP (XU, *et al.*, 1998); * : aminoácido conservado; : : substituição conservativa; . : substituição semiconservativa.

4.2 AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE *glnK* DE *S. mutans* NOS VETORES pGEM-T, pET29a(+) e pET28b(+)

O gene *glnK* de *S. mutans* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *S. mutans* estirpe UA159, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.1.4). O fragmento amplificado de aproximadamente 400 pb, contendo o gene *glnK* de *S. mutans* foi evidenciado por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

O gene *glnK* de *S. mutans* foi primeiramente clonado no vetor pGEM-T (Promega) (item 3.1.4.1), utilizando a técnica de clonagem TA. Esta técnica permite a clonagem direta do fragmento de DNA amplificado, pois a TaqDNA polimerase adiciona uma adenosina na extremidade 3' na dupla fita do amplificado (ZHOU & GOMEZ-SANCHES, 2000). Assim, os fragmentos podem ser unidos a um vetor linearizado com resíduos T protuberantes nas extremidades 3' complementares como vetor pGEM-T. O plasmídeo recombinante contendo o gene *glnK* de *S. mutans* inserido no vetor pGEM-T, denominado de pMEGP1, foi seqüenciado para confirmar a inexistência de mutações no gene eventualmente produzidas durante a PCR.

Posteriormente, o gene *glnK* de *S. mutans* foi subclonado nos vetores de expressão pET29a(+) e pET28b(+), originando os plasmídeos recombinantes pMEGP2 e pMEGP3. O plasmídeo pMEGP2 expressou a proteína GlnK de *S. mutans* em sua forma nativa (GlnK-Sm), e nas células contendo o plasmídeo pMEGP3, a proteína GlnK de *S. mutans* foi expressa fusionada com um oligopeptídeo que contém 6 resíduos de histidina (His₆) na sua extremidade N-terminal (GlnK-His-Sm).

4.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GlnK E GlnK-HIS-Sm EM *E. coli*

Os plasmídeos pMEGP2 e pMEGP3 foram inicialmente transformados na estirpe de *E. coli* RB9065(λDE3) (*glnB*⁻/*glnD*⁻), que apresenta o gene que codifica para a T7 RNA polimerase sob controle do operon *lac*, possibilitando assim a expressão em grandes quantidades das proteínas GlnK-Sm e GlnK-His-Sm, após indução com IPTG ou lactose (BUENO *et al.*, 1985; BENELLI *et al.*, 2001). As condições de indução da síntese da proteína GlnK-Sm na estirpe de *E. coli*

RB9065(λ DE3) foram otimizadas variando a concentração de IPTG e lactose. Conforme observado na Figura 7, a indução da expressão da proteína GlnK-Sm com 0,5 mmol/L de IPTG durante 2,5 horas, resultou em alta expressão da proteína-alvo, com uma menor quantidade de proteínas contaminantes. Uma banda com massa molecular de aproximadamente 12,3 kDa, para a proteína GlnK-Sm, e 14,3 kDa para a proteína GlnK-His-Sm, foi observada nos extratos das células RB9065(λ DE3) induzidas por IPTG.

4.4 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnK-Sm E GlnK-His-Sm

4.4.1 Purificação da Proteína GlnK-Sm

A expressão da proteína GlnK-Sm em *E. coli* RB9065(λ DE3) transformada com o plasmídeo pMEGP2, foi induzida com IPTG 0,5 mmol/L por 2,5 horas (Materiais e Métodos item 3.3.1). Após coleta e lise das células, os ácidos nucleicos presentes no extrato celular foram removidos por precipitação com sulfato de estreptomicina e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de troca aniônica Q-Sepharose (Materiais e Métodos item 3.3.2). A proteína GlnK-Sm foi eluída da coluna Q-Sepharose em aproximadamente 200 – 300 mmol/L de NaCl. As frações obtidas foram agrupadas de acordo com o seu grau de pureza e aplicadas em uma coluna de gel filtração Superdex75 (Materiais e Métodos item 3.3.2). Após essa etapa, as frações foram novamente agrupadas de acordo com o seu grau de pureza e dialisadas contra 0,5 L de tampão D (Materiais e Métodos item 3.3.2). A dosagem de proteínas e eletroforese desnaturante das frações dialisadas demonstraram uma redução significativa da quantidade da proteína GlnK-Sm após a diálise. Além disso, as frações obtidas, tinham alto grau de contaminação (Figura 8).

Como a proteína GlnK-Sm não se encontrava pura após a primeira tentativa de purificação, uma nova abordagem foi utilizada. Após o passo cromatográfico na coluna Q-Sepharose (Materiais e Métodos item 3.3.2), as frações coletadas foram agrupadas e aplicadas em uma coluna de afinidade Hi-Trap Heparin (Materiais e Métodos item 3.3.2) e a proteína GlnK-Sm foi eluída em aproximadamente 400 – 500 mmol/L de NaCl. A análise densitométrica da eletroforese das frações obtidas após diálise contra 0,5 L de tampão D (Materiais e Métodos item 3.3.2) revelou que a proteína GlnK-Sm foi obtida com aproximadamente 92% de pureza neste

procedimento (Figura 9). No entanto, o procedimento de diálise resultou, novamente, numa elevada perda da proteína GlnK-Sm após a diálise, possivelmente devido à proteólise, já que nenhum precipitado de proteína foi detectado.

4.4.2 Purificação da Proteína GlnK-His-Sm

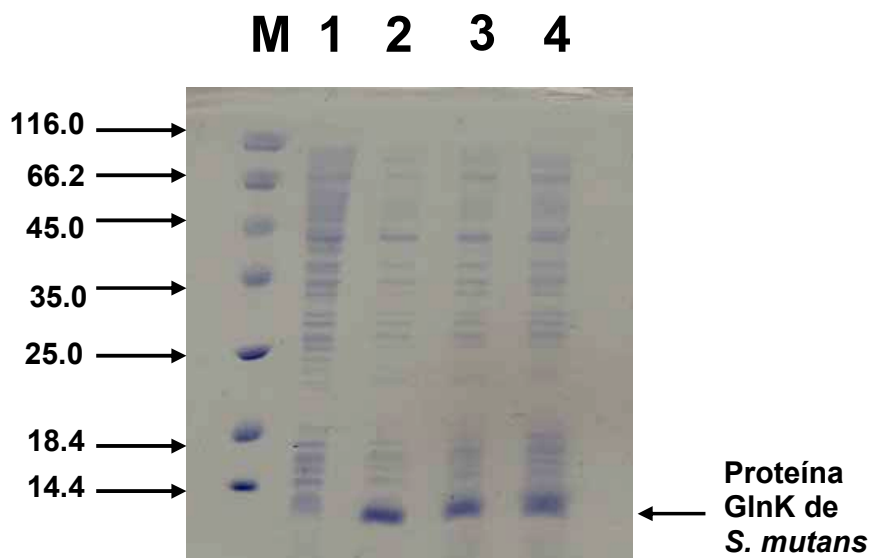
A proteína GlnK-His-Sm apresenta uma cauda poli-histidina em sua extremidade N-terminal, permitindo a purificação da proteína por cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna com íons metálicos, em geral Ni^{2+} , onde os resíduos de histidina expostos da proteína GlnK-His-Sm interagem com íons metálicos ligados à matriz da coluna. Após superexpressão na célula de *E. coli* RB9065(λ DE3), transformada com o plasmídeo pMEGP3, a proteína GlnK-His-Sm foi purificada numa coluna Hi-Trap Chelating- Ni^{2+} conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.3.3). A proteína GlnK-His-Sm foi eluída em aproximadamente 400 – 500 mmol/L de imidazol, e as frações foram agrupadas e dialisadas contra tampão D (Materiais e Métodos item 3.3.2). Embora a proteína GlnK-His-Sm tenha sido obtida com 98% de pureza (Figura 9), a dosagem de proteína e eletroforese desnaturante novamente revelaram perda da proteína GlnK-His-Sm após diálise.

As etapas de purificação foram realizadas em presença de inibidores de protease, mas aparentemente não foi suficiente para evitar a degradação proteolítica. Como a estirpe de *E. coli* RB9065(λ DE3) não é geneticamente modificada para a redução da expressão de proteases, um alto nível basal de expressão das proteínas GlnK-Sm ou GlnK-His-Sm pode ter desencadeado a indução de proteases que os procedimentos de purificação não foram capazes de eliminar.

4.4.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GlnK-His-Sm NA ESTIRPE BL21 AI DE *E. coli* E PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

A síntese da proteína GlnK-His-Sm foi induzida na estirpe BL21 AI de *E. coli* para minimizar os prováveis efeitos tóxicos da síntese em altas concentrações da proteína GlnK-His-Sm em *E. coli* RB9065(λ DE3). A estirpe BL21 AI de *E. coli* possui um baixo nível de proteases e o gene que codifica para a T7 RNA polimerase está sob controle do promotor *ara* nessa estirpe, que possui um controle mais restrito. Após transformação com o plasmídeo pMEGP3, a indução da expressão da proteína-alvo foi feita com L-arabinose (Materiais e Métodos item 3.3.1). Variando a concentração de L-arabinose no meio de cultura é possível controlar de forma eficiente a quantidade de proteína-alvo produzida. As condições de indução da proteína GlnK-His-Sm foram otimizadas em um experimento variando as concentrações de L-arabinose e IPTG. Um nível satisfatório de expressão da proteína-alvo foi obtido com L-arabinose 0,2 %. A proteína GlnK-His-Sm foi purificada numa coluna Hi-Trap Chelating Ni²⁺, (Materiais e Métodos item 3.3.3). A proteína GlnK-His-Sm foi eluída em aproximadamente 400 – 500 mmol/L de imidazol, e as frações foram agrupadas e dialisadas contra tampão D (Materiais e Métodos item 3.3.2). A proteína GlnK-His-Sm foi obtida com 98% de pureza e não houve perda desta proteína após diálise (Figura 10).

FIGURA 7 - PERFIL ELETROFORÉTICO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE ENSAIO DE INDUÇÃO DA PROTEÍNA GlnK DE *S. mutans* COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE IPTG E LACTOSE



Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (15%):

Linha M – marcador de massa molecular em kDa (Fermentas);

Linha 1 – extrato bruto de *E. coli* RB9065(λ DE3)-pMEGP2 (GlnK-Sm) (8 μ g/ μ L) sem indução;

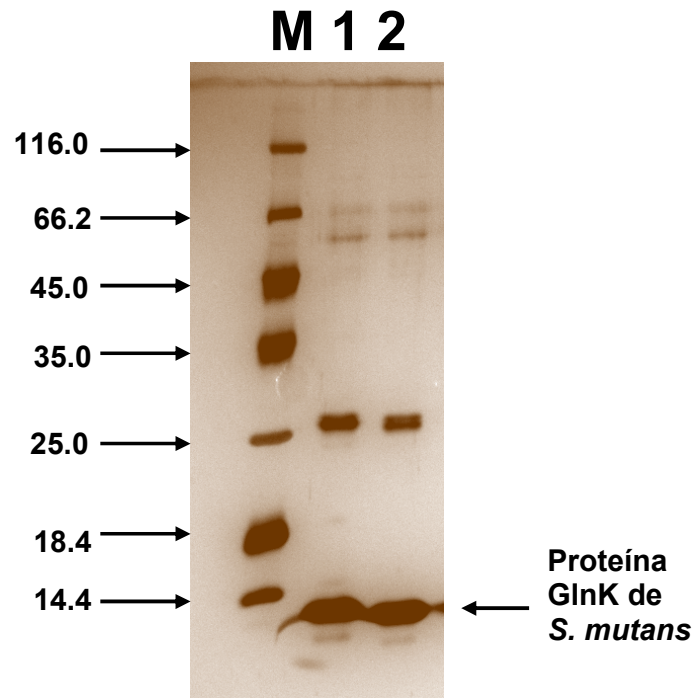
Linha 2 – extrato bruto de *E. coli* RB9065(λ DE3)-pMEGP2 (GlnK-Sm) (8 μ g/ μ L) após indução com 0,5 mmol/L de IPTG;

Linha 3 – extrato bruto de *E. coli* RB9065(λ DE3)-pMEGP2 (GlnK-Sm) (8 μ g/ μ L) após indução com 0,2 mmol/L de IPTG;

Linha 4 – extrato bruto de *E. coli* RB9065(λ DE3)-pMEGP2 (GlnK-Sm) (8 μ g/ μ L) após indução com 0,5 mmol/L de IPTG mais 0,3% de lactose.

As proteínas foram coradas com *coomassie blue*.

FIGURA 8 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES DA PROTEÍNA GlnK DE *S. mutans* PARCIALMENTE PURIFICADA



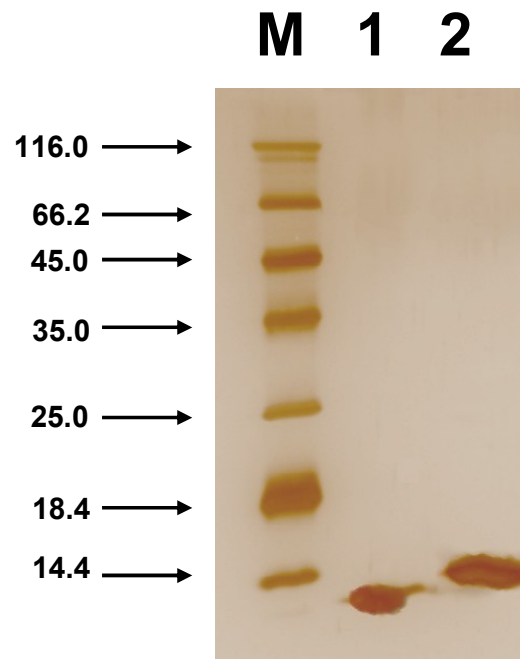
Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (15%):

Linha M – marcador de massa molecular em kDa (Fermentas);

Linhas 1 e 2 – proteína GlnK-Sm (1 µg/µL) purificada frações 1 e 2, respectivamente.

As proteínas foram coradas com prata.

FIGURA 9 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES DAS PROTEÍNAS GlnK E GlnK-His DE *S. mutans* PURIFICADAS



Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (15%):

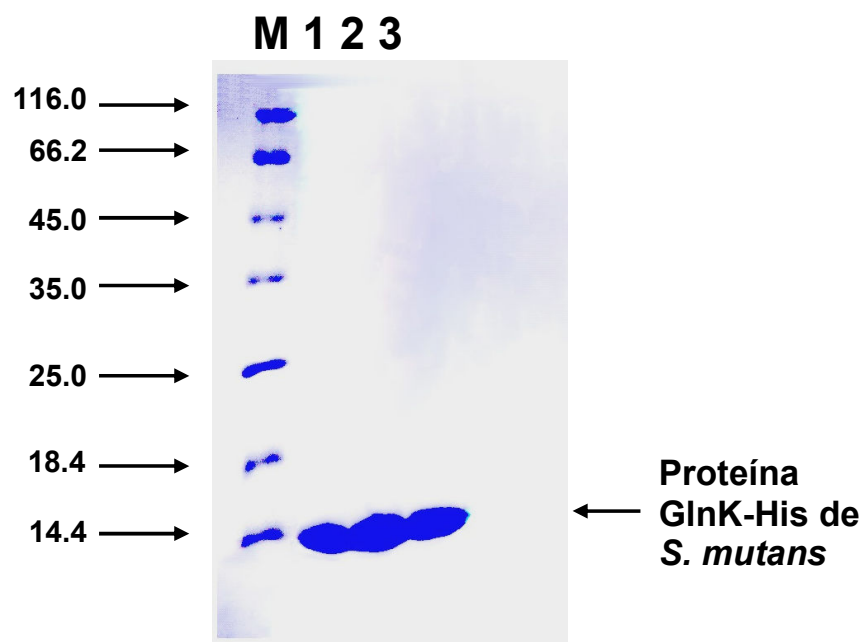
Linha M – marcador de massa molecular em kDa (Fermentas);

Linha 1 – proteína GlnK-Sm purificada (1 µg/µL);

Linha 2 – proteína GlnK-His-Sm purificada (1 µg/µL).

As proteínas foram coradas com prata.

FIGURA 10 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SOB CONDIÇÕES DESNATURANTES DA PROTEÍNA GlnK-His DE *S. mutans* PURIFICADA



Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (15%):

Linha M – marcador de massa molecular em kDa (Fermentas);

Linhas 1 a 3 – proteína GlnK-His-Sm purificada (10 µg/µL).

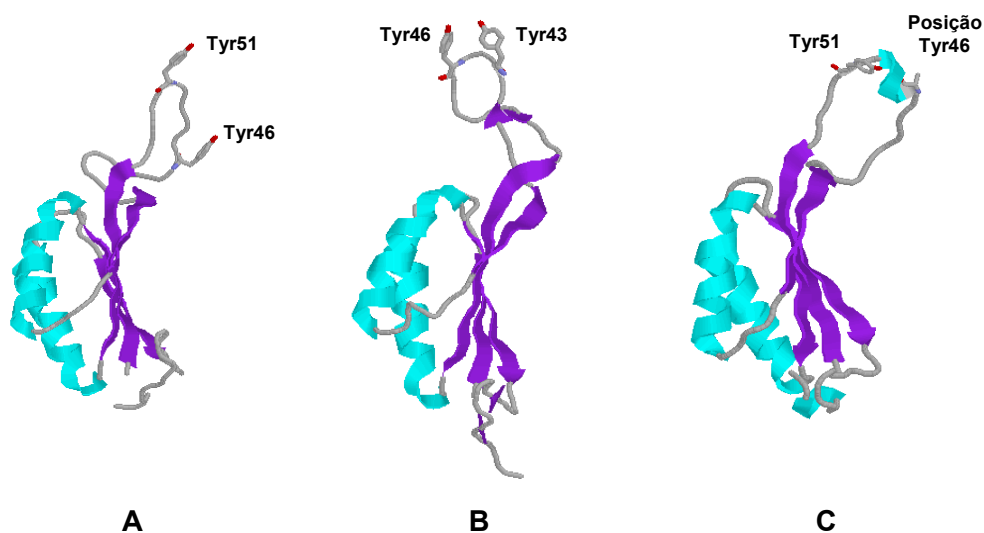
As proteínas foram coradas com *coomassie blue*.

4.5 ENSAIO DE URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA GlnK-His-Sm PELA PROTEÍNA GlnD DE *E. coli*

Em *E. coli*, quando a relação glutamina/2-oxoglutarato é baixa, a proteína GlnD apresenta atividade de uridililtransferase e uridilila as proteínas GlnB e/ou GlnK, no resíduo Tyr51. Assim, as proteínas GlnB-UMP e/ou GlnK-UMP desencadeiam respostas celulares específicas frente às baixas concentrações de nitrogênio (SON & RHEE, 1987, van HEESWIJK *et al.*, 1996). De maneira semelhante, a proteína GlnB de *H. seropedicae* é uridililada pelo extrato livre de células deste organismo e pela proteína GlnD de *E. coli*, no resíduo Tyr51, sob condições de limitação de nitrogênio (BENELLI *et al.*, 2001).

Embora a proteína GlnK-Sm não apresente o resíduo Tyr51 conservado, essa proteína possui os resíduos Tyr43 e Tyr46, que também fazem parte da volta T e poderiam estar acessíveis para uridililação. No modelo estrutural proposto para a proteína GlnK-Sm pelo programa 3D-JIGSAW (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw>), tais resíduos aparecem na superfície da proteína (Figura 11). Assim, ensaios de uridililação foram realizados para verificar se a proteína GlnK-His-Sm poderia ser uridililada pela proteína GlnD de *E. coli*. Os ensaios de uridililação foram realizados na presença da proteína GlnD de *E. coli* e utilizando a proteína GlnB de *H. seropedicae* como controle, conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.5). Quando a proteína GlnB é uridililada, a velocidade de migração eletroforética aumenta de forma proporcional ao número de monômeros uridililados. Assim, quatro bandas podem ser visualizadas: GlnB, GlnB-(UMP)₁, GlnB-(UMP)₂ e GlnB-(UMP)₃. A Figura 12 demonstra que a proteína GlnK-His-Sm não é uridililada pela proteína GlnD de *E. coli*.

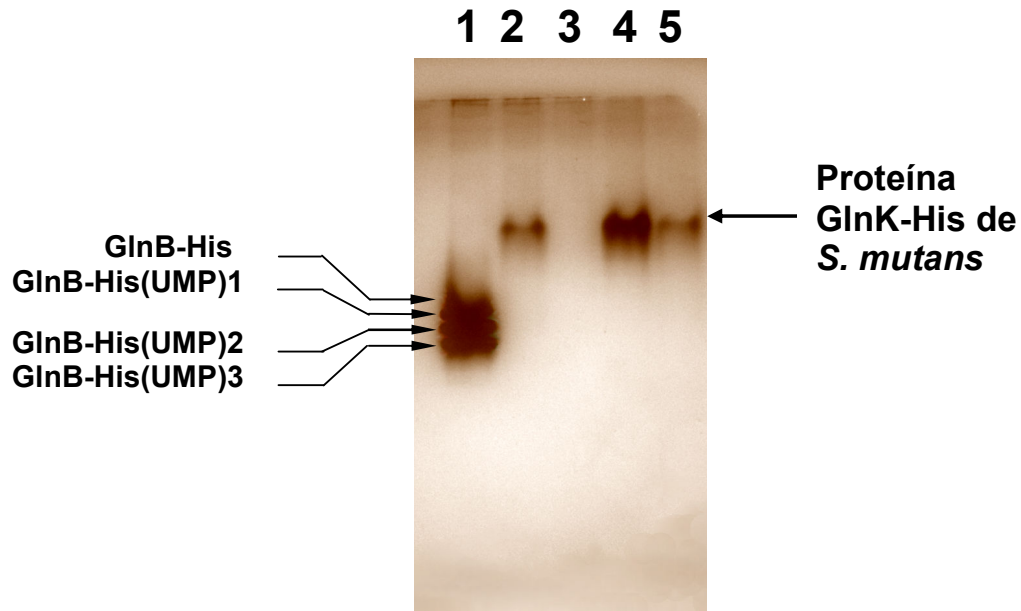
FIGURA 11 - ESTRUTURA DO MONÔMERO DAS PROTEÍNAS DO TIPO PII DE *E. coli* E *S. mutans*



GlnB de *E. coli* (**A**), GlnK de *S. mutans* (**B**) e GlnK de *E. coli* (**C**).

A estrutura do monômero das proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* foi obtida através do PDB (Protein Data Bank - ID: 2pii e 1GIK, respectivamente) e o modelo estrutural para o monômero da proteína GlnK de *S. mutans* foi obtido através do programa 3D-JIGSAW. (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3djigsaw/>). Os modelos estruturais das proteínas da família PII de *E. coli* e *S. mutans* foram desenhados através do programa RasMol (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>).

FIGURA 12 - PERFIL DE URIDILILAÇÃO DAS PROTEÍNAS GlnB-His DE *H. seropedicae* E GlnK-His DE *S. mutans*



Eletroforese nativa descontinua:

Linha 1 - proteína GlnB-His de *H. seropedicae* (2 μ mol/L); reação de uridililação completa;

Linha 2 - proteína GlnK-His-Sm (2 μ mol/L); reação de uridililação completa;

Linha 3 - reação de uridililação sem a proteína GlnK-His-Sm

Linha 4 - proteína GlnK-His-Sm (2 μ mol/L); reação de uridililação sem GlnD;

Linha 5 - proteína GlnK-His-Sm (2 μ mol/L); reação de uridililação sem UTP.

As proteínas foram coradas com prata.

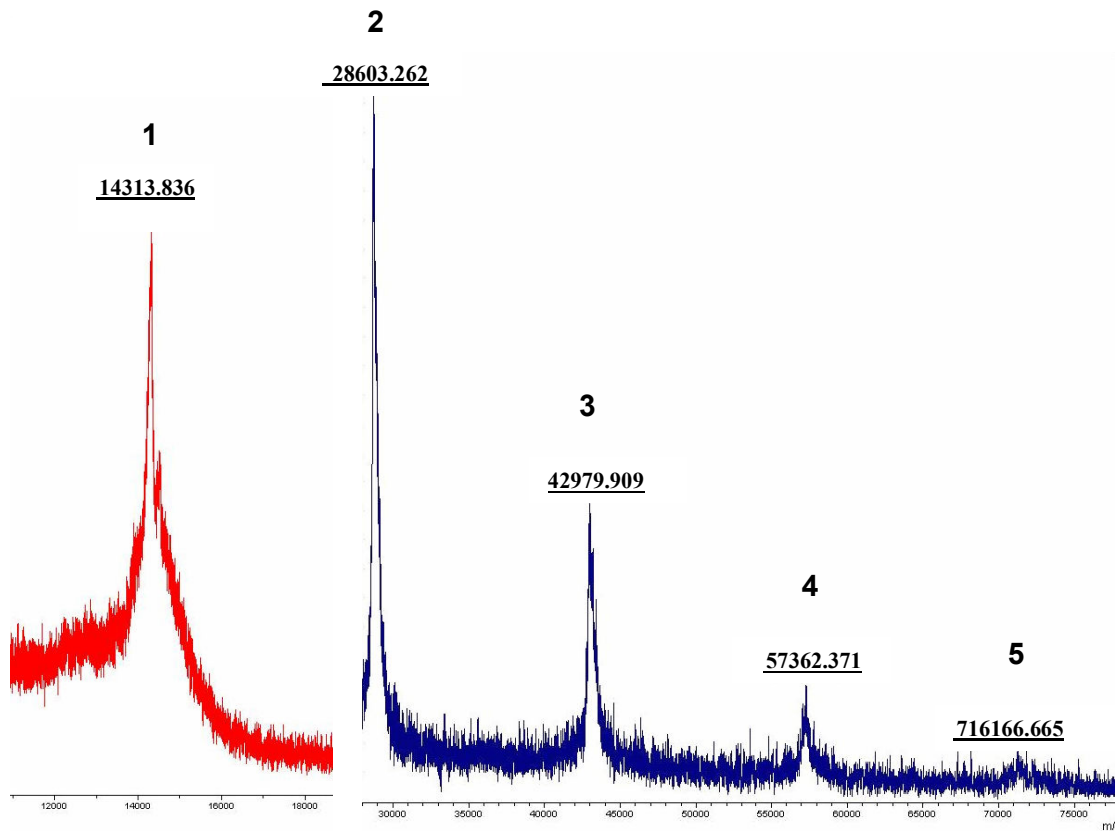
4.6 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA PROTEÍNA GlnK-His-Sm

A proteína GlnB de *E. coli* é um homotrímero e cada monômero é formado por duas α -hélices e seis folhas β -pregueadas. As duas α -hélices e as folhas β -pregueadas 1 a 4 formam um motivo $\beta\alpha\beta$, conectado pela volta T (resíduos 37-55), na qual se localiza o resíduo de Tyr51. Na estrutura do trímero, a região das voltas B e T de um monômero está posicionada adjacente à volta C do outro monômero, formando uma cavidade lateral na interface das subunidades. Na estrutura trimérica da proteína GlnB de *E. coli*, as folhas β -pregueadas estão voltadas para o interior da molécula formando uma cavidade central e as α -hélices estão voltadas para a face externa da molécula (CARR *et al.*, 1996). A proteína GlnK de *E. coli* e a proteína GlnB de *H. seropedicae* também formam um trímero, com a estrutura do núcleo semelhante à da proteína GlnB de *E. coli* (XU *et al.*, 1998; BENELLI *et al.*, 2002), assim como nos demais organismos em que a estrutura das proteínas do tipo PII foi determinada (XU *et al.*, 2003; SCHWARZENBACHER *et al.*, 2004; SAKAI *et al.*, 2005).

Como observado em outros organismos, o gene *glnK* de *S. mutans* codifica para uma proteína com massa molecular monomérica de aproximadamente 12,3 kDa. Assim, a massa molecular da proteína GlnK-His-Sm foi primeiramente determinada por análise espectrométrica de massa MALDI-ToF, conforme descrito em materiais e métodos (item 3.3.7.2). Os resultados mostram a presença da proteína GlnK-His-Sm nas suas formas monomérica (14,3 kDa), dimérica (28,6 kDa), trimérica (42,9 kDa), tetramérica (57,2 kDa) e possivelmente, pentamérica (71,5 kDa) de sinal menos intenso (Figura 13). A ionização de uma proteína, por remoção a laser assistida por matriz (MALDI), depende da capacidade da matriz de gerar íons a partir dessas macromoléculas não voláteis e portanto, quanto maior a proteína, mais difícil será a protonação da mesma pela matriz para que possa ser atraída pelo campo eletromagnético, dificultando a visualização de picos de massa molecular alta. Assim, considerando as dificuldades técnicas para confirmar a massa molecular da proteína GlnK-His-Sm por espectrometria de massa, a massa molecular dessa proteína foi determinada por gel filtração, em uma coluna Superdex 200 HR10/30 (Materiais e Métodos item 3.3.7.1).

O perfil de eluição da proteína GlnK-His-Sm permitiu estimar a massa molecular em aproximadamente 85 kDa, o que é compatível com uma estrutura hexamérica para a proteína GlnK-His-Sm. A estrutura destes hexâmeros pode ser formada pela associação de dois trímeros ou pela associação de seis monômeros (Figura 14).

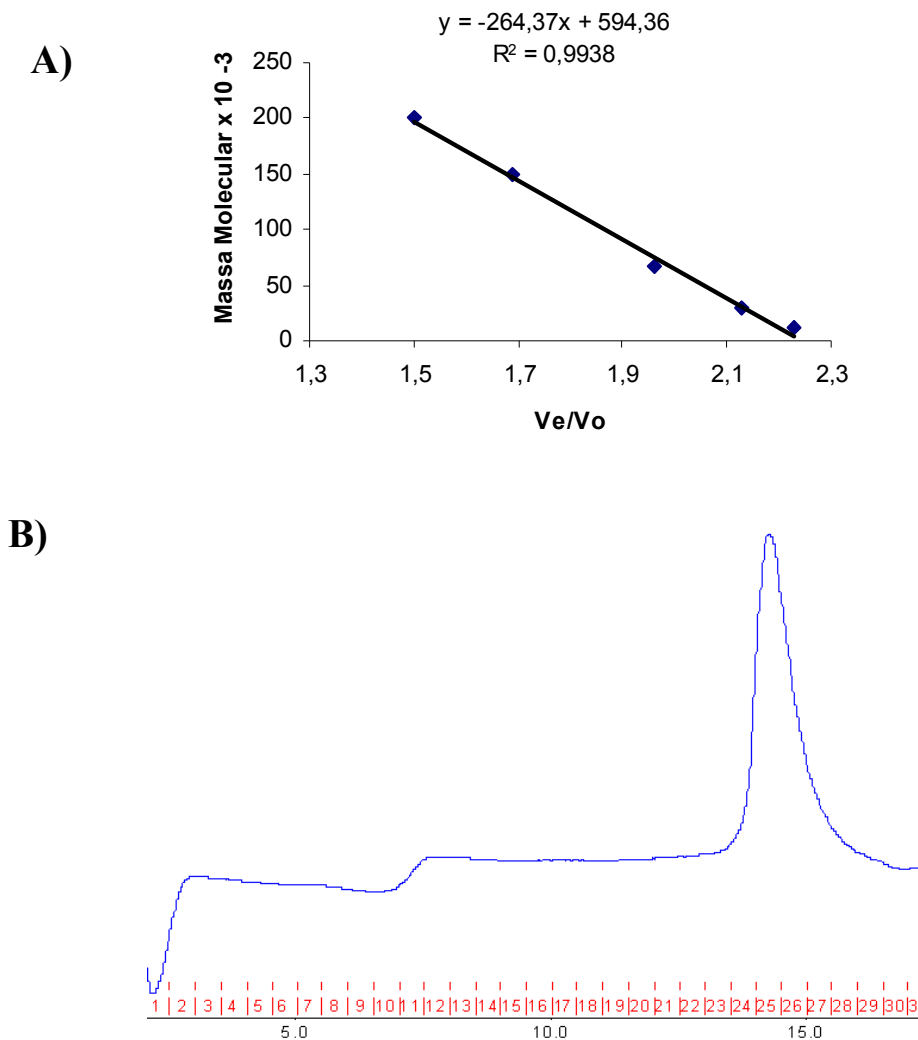
FIGURA 13 – ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DE MASSA DA PROTEÍNA GlnK-His DE *S. mutans*



Picos correspondentes à proteína GlnK-His-Sm nas suas formas:

- 1 - monomérica (14,3 kDa);
- 2 - dimérica (28,6 kDa);
- 3 - trimérica (42,9 kDa);
- 4 - tetramérica (57,3 kDa);
- 5 - possivelmente pentamérica (71,6 kDa).

FIGURA 14 – DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA PROTEÍNA GlnK-His de *S. mutans* POR GEL FILTRAÇÃO



A) As razões V_e/V_o das proteínas-padrão (kit SIGMA-EUA) e da proteína GlnK-His-Sm foram calculadas a partir dos perfis de eluição destas proteínas em coluna Superdex 200 HR10/30 conectada a um sistema ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences). O gráfico acima foi construído e utilizado para determinar a massa molecular da proteína GlnK-His-Sm. A razão V_e/V_o calculada para a proteína GlnK-His-Sm foi 1,927.

B) Perfil de eluição da proteína GlnK-His-Sm.4.7 em coluna Superdex 200 HR10/30.

4.7 ESTUDOS *IN VIVO* DO EFEITO DAS PROTEÍNAS GlnK-Sm E GlnK-His-Sm SOBRE O SISTEMA NifL-NifA DE *K. pneumoniae*

4.7.1 Clonagem dos genes *glnK* e *glnK-His* de *S. mutans* no vetor pTZ18R e obtenção dos Transconjugantes Para os Ensaio de β -Galactosidase

Para estudar o efeito das proteínas GlnK-Sm e GlnK-His-Sm sobre o sistema NifL-NifA de *K. pneumoniae*, os genes *glnK* e *glnK-His* foram subclonados no vetor pTZ18R conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.1.7), originando os plasmídeos pMEGP4 (contendo o gene *glnK*) e pMEGP5 (contendo o gene *glnK-His*). Esses plasmídeos foram então transformados nas estirpes de *E. coli* YMC10 (selvagem), UNF3435 (*glnB*⁻ *glnK*⁻) e NCM1686 (*glnD*⁻). Essas estirpes de *E. coli* contêm uma fusão cromossomal $\Phi(nifH' - lacZ)$ e foram previamente eletroporadas com o plasmídeo pCC46, que contém o operon *nifLA* de *K. pneumoniae* expresso a partir do promotor *lac*. Neste sistema, a atividade de NifA é avaliada pelo nível de expressão do promotor *nifH*, que é quantificado pela determinação da atividade de β -galactosidase nessas estirpes. Os plasmídeos pDK601 (*glnB* de *E. coli*), pWVH149 (*glnK* de *E. coli*) e o vetor pTZ18R também foram introduzidos separadamente em cada uma das estirpes por eletroporação, como controle da atividade de β -galactosidase.

4.7.2 Efeito da proteína GlnK-Sm sobre o complexo NifL-NifA de *K. pneumoniae*

Em *K. pneumoniae*, a transcrição dos genes *nif* (genes estruturais para o complexo da nitrogenase) é dependente da proteína NifA, que tem sua atividade controlada pela proteína NifL. Em altas concentrações de amônio e/ou oxigênio, NifL interage com NifA, impedindo que esta ative a transcrição dos genes *nif*. Quando os níveis de amônio diminuem, a proteína GlnK, uridililada ou não, promove a dissociação do complexo NifL-NifA. Assim, a proteína NifA livre é capaz de ativar a transcrição dos genes *nif* (HE *et al.*, 1997; HE *et al.*, 1998; ARCONDÉGUY *et al.*, 1999 ; BARRET *et al.*, 2001).

O efeito da proteína GlnK-Sm sobre a atividade da proteína NifA de *K. pneumoniae* foi avaliado usando mutantes de *E. coli* que continham fusão

cromossomal $\Phi(nifH' - lacZ)$ e um plasmídeo que expressava constitutivamente o operon *nifLA* de *K. pneumoniae*. Como controle foram utilizadas as proteínas GlnB e GlnK de *E. coli*, pois o efeito dessas proteínas sobre esse sistema já é conhecido (HE *et al.*, 1998; BONATTO *et al.*, 2005). Os resultados da atividade de β -galactosidase obtidos com as estirpes YMC10 (selvagem), UNF3435 (*glnB⁻ glnK⁻*) e NCM1686 (*glnD⁻*) contendo o vetor pTZ18R são semelhantes aos resultados obtidos por HE *et al.* (1998) e BONATTO *et al.* (2005), e indicam que a proteína GlnK é necessária para desfazer o complexo NifL-NifA, uma vez que a estirpe UNF3435 (*glnB⁻ glnK⁻*), contendo apenas o vetor pTZ18R, apresentou atividade basal de β -galactosidase quando comparada com a da estirpe YMC10 (selvagem), tanto em condições de alta concentração de amônio quanto em condições de desrepressão (Figura 15; Tabela 4). A estirpe NCM1686 (*glnD⁻*) apresentou atividade basal de β -galactosidase ligeiramente superior a da estirpe UNF3435 (*glnB⁻ glnK⁻*). Nessa estirpe, a proteína GlnK não é expressa devido à ausência de GlnD. Como a proteína GlnB está constantemente desuridilada na estirpe NCM1686 (*glnD⁻*), a atividade de fosfatase de NtrB é estimulada. Assim, NtrC é constitutivamente desfosforilada e incapaz de ativar a expressão de *glnK* (ATKINSON & NINFA, 1998). Neste caso a presença de GlnB provavelmente é responsável pela maior atividade basal de β -galactosidase da estirpe NCM1686 (*glnD⁻*).

A presença de altas concentrações da proteína GlnK de *E. coli* nas estirpes UNF3435 (*glnB⁻ glnK⁻*) e NCM1686 (*glnD⁻*), restaurou a atividade de NifA (Figura 15; Tabela 4) indicando que GlnK é capaz de desfazer o complexo NifL-NifA independentemente do seu estado de uridilação, como sugeriram HE *et al.* (1998) e BONATTO *et al.* (2005). De maneira semelhante, altas concentrações de GlnB nas estirpes UNF3435 (*glnB⁻ glnK⁻*) e NCM1686 (*glnD⁻*) restauraram a atividade de NifA, embora com uma menor regulação por amônio do que a observada na presença da proteína GlnK (Figura 15; Tabela 4). Quando a proteína GlnB é expressa a partir de seu próprio promotor, ela não é capaz de impedir a formação do complexo NifL-NifA (HE *et al.*, 1998). O complexo NifL-NifA só é desfeito quando a expressão de GlnB está sob controle do promotor *lac*, sugerindo que, em altas concentrações, GlnB é capaz de substituir GlnK nessa função (ARCONDÉGUY *et al.*, 1999).

Na estirpe selvagem de *E. coli*, a atividade de β -galactosidase é drasticamente reduzida a níveis basais na presença da proteína GlnK-Sm. (Figura 15; Tabela 4). Estes resultados podem ser devidos a proteína GlnK-Sm:

a) não se ligar ao complexo NifL-NifA, evitando a liberação de NifA, mas poder interagir com as proteínas GlnB e GlnK de *E. coli*, formando hetero-oligômeros não funcionais;

b) ligar-se ao complexo NifL-NifA, mas ser incapaz de liberar NifA e, devido à sua alta concentração intracelular, impedir o acesso das proteínas GlnB e GlnK a este complexo;

c) interagir fortemente com NifA livre, impedindo sua ligação ao promotor de *nifH*;

d) interagir com a proteína GlnD de *E. coli*, impedindo a expressão de GlnK;

e) interagir com o promotor *nifH* de *K. pneumonia* impedindo a ligação de NifA.

Em qualquer uma dessas hipóteses, a proteína GlnK-Sm apresentaria afinidade e atividade biológica diferentes das proteínas GlnK e GlnB de *E. coli* ou GlnB de *H. seropedicae* (HE *et al.*, 1998; BONATTO *et al.*, 2005), com relação à capacidade de ativar a proteína NifA de *K. pneumoniae* em *E. coli*.

BONATTO *et al.* (2005) mostraram que, embora a ativação da proteína NifA de *K. pneumoniae* pela proteína GlnB de *H. seropedicae* não dependa do estado de uridililação de GlnB, a presença do resíduo Tyr51, na volta T, é importante para a interação da proteína GlnB de *H. seropedicae* com o complexo NifL-NifA de *K. pneumoniae*. Estes autores também demonstraram que, embora os mutantes Y51F e G108A/P109A da proteína GlnB de *H. seropedicae* consigam complementar parcialmente os mutantes *glnD*⁻ e *glnB*⁻*glnK*⁻ de *E. coli*, essas proteínas não são capazes de bloquear o efeito das proteínas GlnB e GlnK deste organismo, como observado para a proteína GlnK-Sm (BONATTO *et al.*, 2005). Assim, a ausência do resíduo Tyr51 na proteína GlnK-Sm, associada a sua possível estrutura hexamérica, reduziria a afinidade, ou impediria a interação desta proteína com o complexo NifL-NifA.

Os ensaios de uridililação mostraram que a proteína GlnK-His-Sm não é uridililada pela proteína GlnD de *E. coli*, o que não exclui a possibilidade de

interação entre essas proteínas. Esta hipótese é reforçada pela presença do resíduo Gly41, no monômero da proteína GlnK-Sm (Figura 5), considerado essencial para a interação das proteínas GlnB e GlnD de *E. coli* (JIANG *et al.*, 1997). A substituição da Gly41 por Ala inibe completamente a interação entre as proteínas GlnB e GlnD de *E. coli*. Desta forma, a proteína GlnK-Sm em altas concentrações poderia ligar-se a GlnD de *E. coli*, que não estaria disponível para uridililar GlnB e, conseqüentemente, NtrC não poderia ativar a transcrição de *glnK*. Ao mesmo tempo, a possível interação de GlnK-Sm com GlnD de *E. coli* poderia estar titulando GlnK-Sm, o que impediria uma possível ativação de NifA por GlnK de *S. mutans*. Como a proteína GlnK-Sm pode ser um hexamérica *in vivo*, a sua concentração intracelular pode não ser semelhante àquelas obtidas com as proteínas GlnB e GlnK de *E. coli*, quando são expressas nas mesmas condições. Além disso, dependendo da estrutura tridimensional da proteína GlnK-Sm, a superfície do hexâmero pode apresentar mais ou menos sítios de ligação para ATP, 2-oxoglutarato e sítios de reconhecimento para proteínas-alvo, quando comparada com as proteínas do tipo PII triméricas, o que contribuiria para alterar sua atividade biológica. Todavia, os reais motivos para a inativação de NifA mesmo sob condições limitantes de nitrogênio, na estirpe YMC10 (selvagem), precisam ser esclarecidos.

O efeito da proteína GlnK-Sm na estirpe UNF3435 (*glnB⁻ glnK⁻*) mostra que, na ausência de GlnB e GlnK de *E. coli*, a proteína GlnK-Sm é incapaz de restaurar a atividade de NifA (Figura 15; Tabela 4). Estes resultados sugerem que as proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* não são as principais causas do efeito observado na presença da proteína GlnK-Sm nessa estirpe, mas não excluem as hipóteses sugeridas anteriormente. Na estirpe NCM1686 (*glnD⁻*), a presença da proteína GlnK-Sm promoveu uma atividade de β -galactosidase maior que a observada na estirpe UNF3435 (*glnB⁻ glnK⁻*) (Figura 15; Tabela 4). Uma das possíveis explicações para este resultado seria que a proteína GlnK-Sm interagisse com GlnD de *E. coli* e, na ausência de GlnD, a concentração intracelular de GlnK-Sm livre aumentaria, permitido que a proteína GlnK-Sm aliviasse, ainda que muito pouco, a inibição de NifL sobre NifA. Entretanto, a mutação *glnD⁻* em *E. coli* apresenta efeito pleiotrópico, o que dificulta a interpretação dos resultados.

4.7.3. Efeito da proteína GlnK-His-Sm sobre o complexo NifL-NifA de *K. pneumoniae*

Na presença da proteína GlnK-His-Sm, a atividade de NifA foi maior nas três estirpes testadas, quando comparada com a atividade na presença da proteína GlnK-Sm (Figura 15; Tabela 4). Estes resultados sugerem que a cauda His, formada por 20 aminoácidos fusionados à porção N-terminal da proteína GlnK-Sm, alteram de maneira significativa a atividade desta proteína. O efeito diferenciado na atividade das proteínas com e sem cauda His também foi observado por BENELLI (1997). A proteína GlnB-His de *H. seropedicae* foi uridililada pelo extrato livre de células deste organismo e pela proteína GlnD de *E. coli*. Entretanto, a velocidade de uridililação da proteína GlnB-His foi menor do que a observada para a proteína GlnB nativa. Além disso, a proteína GlnB nativa apresentou 10-15% de uridililação mesmo na ausência de 2-oxoglutarato, enquanto que nenhuma uridililação foi observada para a proteína GlnB-His nessas condições (BENELLI, 1997).

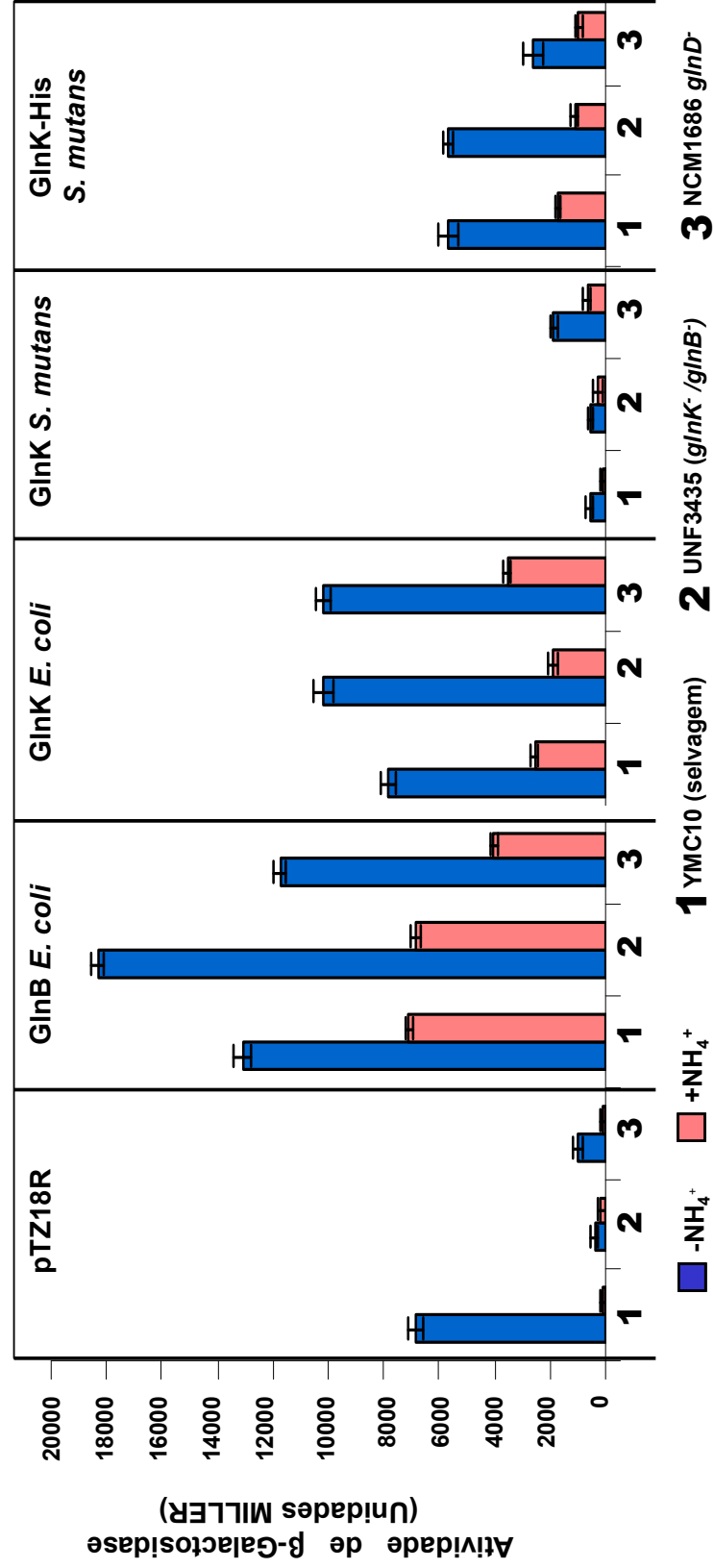
Na presença da proteína GlnK-His-Sm, a atividade de NifA é semelhante à observada na estirpe YMC10 (selvagem) com o vetor pTZ18R, embora a regulação por amônio seja 30 % menor naquela (Figura 15; Tabela 4). Estes resultados são diferentes do observado para a proteína GlnK-Sm, já que a proteína GlnK-His-Sm não impede a atividade de GlnK de *E. coli* sobre NifA na estirpe YMC10 (selvagem). Além de aumentar a massa molecular da proteína, a presença da cauda His altera o pI teórico da proteína GlnK-Sm de 6,59 para 8,08 na GlnK-His-Sm. Provavelmente, esta cauda provoca mudanças de polaridade e estrutura que modificariam a afinidade e atividade da proteína GlnK-His-Sm. Assim, pode ser que a proteína GlnK-His-Sm não forme hetero-oligômeros com as proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* que livres apresentariam atividade biológica ou que, no caso destes hetero-oligômeros serem formados, eles não afetariam ativação de NifA nem a atividade de GlnB de *E. coli*, na estirpe YMC10 (selvagem).

Os resultados deste trabalho mostraram que a proteína GlnK-His-Sm é capaz de restaurar a atividade de NifA na estirpe UNF3435 (*glnB⁻ glnK⁻*), com um pequeno aumento (9 %) na regulação por amônio quando comparada com a estirpe YMC10 (selvagem) (Figura 15; Tabela 4). As diferenças observadas entre as proteínas GlnK-Sm e GlnK-His-Sm, sobre a atividade de NifA na estirpe UNF3435 (*glnB⁻ glnK⁻*),

provavelmente devem-se à presença da cauda poli-histidina na proteína GlnK-His-Sm.

Analisando os resultados obtidos com a proteína GlnK-His-Sm na estirpe NCM1686 (*glnD*⁻), pode-se observar que a atividade de NifA diminuiu aproximadamente 50 % em relação à estirpe UNF3435 (*glnB*⁻ *glnK*⁻), ao mesmo tempo em que a regulação por amônio diminuiu 15 %. Estes resultados podem sugerir que a ausência de GlnD na estirpe NCM1686 (*glnD*⁻) seria responsável pela menor atividade de β -galactosidase em relação à estirpe UNF3435 (*glnB*⁻ *glnK*⁻). Entretanto, a mutação *glnD*⁻ em *E. coli* apresenta efeito pleiotrópico, o que dificulta a interpretação dos resultados.

FIGURA 15 – EFEITO DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PII DE *E. coli* E *S. mutans* SOBRE A ATIVAÇÃO DO PROMOTOR *nifH* DE *K. pneumoniae*



Todas as estirpes contêm uma fusão cromossomal $\Phi(nifH'-lacZ)$ e o plasmídeo pCC46 que contém o operon *nifLA* de *K. pneumoniae*. Os ensaios foram realizados em anaerobiose, na presença ou na ausência de 20 mmol/L de NH_4Cl . Os resultados são a média de pelo menos três experimentos independentes.

TABELA 4 – EFEITO DAS PROTEÍNAS GlnK E GlnK-His de *S. mutans* SOBRE A REGULAÇÃO POR AMÔNIO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO NifL-NifA DE *K. pneumoniae*

Estirpe	Genótipo	Plasmídeo	Condição	Ativ. de β -gal (Un. Miller)	Regulação por Amônio(%)
YMC10	selvagem	pTZ18R	-	6859	1
YMC10	selvagem	pTZ18R	+	91	
YMC10	selvagem	pWVH149 (<i>glnK</i> de <i>E. coli</i>)	-	7843	32
YMC10	selvagem	pWVH149 (<i>glnK</i> de <i>E. coli</i>)	+	2558	
YMC10	selvagem	pDK601 (<i>glnB</i> de <i>E. coli</i>)	-	13102	54
YMC10	selvagem	pDK601 (<i>glnB</i> de <i>E. coli</i>)	+	7076	
YMC10	selvagem	pMEGP4 (<i>glnK</i> de <i>S. mutans</i>)	-	587	12
YMC10	selvagem	pMEGP4 (<i>glnK</i> de <i>S. mutans</i>)	+	74	
YMC10	selvagem	pMEGP5 (<i>glnK</i> -His de <i>S. mutans</i>)	-	5661	30
YMC10	selvagem	pMEGP5 (<i>glnK</i> -His de <i>S. mutans</i>)	+	1688	
UNF3435	<i>glnB</i> ⁻ / <i>glnK</i> ⁻	pTZ18R	-	375	40
UNF3435	<i>glnB</i> ⁻ / <i>glnK</i> ⁻	pTZ18R	+	152	
UNF3435	<i>glnB</i> ⁻ / <i>glnK</i> ⁻	pWVH149 (<i>glnK</i> de <i>E. coli</i>)	-	10175	18
UNF3435	<i>glnB</i> ⁻ / <i>glnK</i> ⁻	pWVH149 (<i>glnK</i> de <i>E. coli</i>)	+	1906	
UNF3435	<i>glnB</i> ⁻ / <i>glnK</i> ⁻	pDK601 (<i>glnB</i> de <i>E. coli</i>)	-	18328	37
UNF3435	<i>glnB</i> ⁻ / <i>glnK</i> ⁻	pDK601 (<i>glnB</i> de <i>E. coli</i>)	+	6844	
UNF3435	<i>glnB</i> ⁻ / <i>glnK</i> ⁻	pMEGP4 (<i>glnK</i> de <i>S. mutans</i>)	-	507	50
UNF3435	<i>glnB</i> ⁻ / <i>glnK</i> ⁻	pMEGP4 (<i>glnK</i> de <i>S. mutans</i>)	+	254	
UNF3435	<i>glnB</i> ⁻ / <i>glnK</i> ⁻	pMEGP5 (<i>glnK</i> -His de <i>S. mutans</i>)	-	5678	21
UNF3435	<i>glnB</i> ⁻ / <i>glnK</i> ⁻	pMEGP5 (<i>glnK</i> -His de <i>S. mutans</i>)	+	1215	
NCM1686	<i>glnD</i> ⁻	pTZ18R	-	961	7
NCM1686	<i>glnD</i> ⁻	pTZ18R	+	62	
NCM1686	<i>glnD</i> ⁻	pWVH149 (<i>glnK</i> de <i>E. coli</i>)	-	10181	34
NCM1686	<i>glnD</i> ⁻	pWVH149 (<i>glnK</i> de <i>E. coli</i>)	+	3548	
NCM1686	<i>glnD</i> ⁻	pDK601 (<i>glnB</i> de <i>E. coli</i>)	-	11736	35
NCM1686	<i>glnD</i> ⁻	pDK601 (<i>glnB</i> de <i>E. coli</i>)	+	4048	
NCM1686	<i>glnD</i> ⁻	pMEGP4 (<i>glnK</i> de <i>S. mutans</i>)	-	1848	35
NCM1686	<i>glnD</i> ⁻	pMEGP4 (<i>glnK</i> de <i>S. mutans</i>)	+	648	
NCM1686	<i>glnD</i> ⁻	pMEGP5 (<i>glnK</i> -His de <i>S. mutans</i>)	-	2590	36
NCM1686	<i>glnD</i> ⁻	pMEGP5 (<i>glnK</i> -His de <i>S. mutans</i>)	+	948	

A porcentagem de regulação por amônio foi calculada para cada plasmídeo considerando o valor da atividade de β -galactosidase obtida na ausência de amônio como 100%. + : com NH_4^+ ; - : sem NH_4^+ .

5. CONCLUSÕES

A proteína GlnK de *S. mutans* provavelmente é hexamérica em solução;

A proteína GlnK-His de *S. mutans* não é uridililada pela proteína GlnD de *E. coli*;

As proteínas GlnK nativa e GlnK-His de *S. mutans* são funcionalmente diferentes. Em *E. coli*, a proteína GlnK-His de *S. mutans* é capaz de impedir a inibição da proteína NifA por NifL, ao contrário da proteína GlnK de *S. mutans*.

Em *E. coli*, a proteína GlnK de *S. mutans* bloqueia o efeito das proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* sobre o complexo NifLA.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBE, K.; TAKAHASHI-ABBE, S.; YAMADA, T. Involvement of oxygen-sensitive pyruvate formate-lyase in mixed acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobiose conditions. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 152, p. 175-182, 1982.

ABBE, K.; CARLSSON, J.; TAKAHASHI-ABBE, S.; YAMADA, T. Oxygen and the sugar metabolism in oral streptococci. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, Helsinki, v. 87(4), p. 477-487, 1991.

ADLER, S. P.; PURICH, D.; STADTMAN, E. R. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylyl-removing enzyme. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 250, p. 6264 – 6272, 1975.

AJDIC, D.; MCSHAN, W. M.; MCLAUGHLIN, R. E.; SAVÍĆ, G.; CHANG, J.; CARSON, M. B.; PRIMEAUX, C. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 99, p. 14434-14439, 2002.

ALALUUSUA, S.; ALALUUSUA, S. J.; KARJALAINEN, J.; SAARELA, M.; HOLTINEN, T.; KALLIO, M.; HOLTTA, P.; TORKKO, R.; RELANDER, P.; ASIKAINEN, S. The demonstration by ribotyping of the stability of oral *Streptococcus mutans* infection over 5 to 7 years in children. **Arch. Oral. Biol.**, Oxford, v. 39 (6), p. 467-471, 1994.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. M.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. Garland Publishing Inc., New York, p. 792-793, 1994.

ALDEHNI, M. F.; SAUER, J.; SPIELHAUPT, C.; SCHMID, R.; FRCHHAMMER, K. Signal transduction protein P_{II} is required for NtcA-regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 185, p. 2582-2591, 2003.

ALLEN, M. M. Inclusions: cyanophycin. **Methods Enzymol.**, San Diego, v. 167, p. 207-213, 1988.

ALVAREZ-MORALES, A.; DIXON, R.; MERRICK, M. Positive and negative control of the *glnA ntrBC* regulon in *Klebsiella pneumoniae*. **EMBO J.**, Oxford, v. 3 (3), p. 501-507, 1984.

ANDERSSON, C.; SUND, M. L.; LINDER, L. Peptide utilization by oral streptococci. **Infect. Immun.**, Washington, v. 43 (2), p. 555-560, 1984.

ANDRADE, S. L. A.; DICKMANN, A.; FICNER, R.; EINSLE, O. Crystal structure of the archeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 102, p. 14994-14999, 2005.

ARCONDÉGUY, T.; van HEESWIJK, W. C.; MERRICK, M. Studies on the roles of GlnK and GlnB in regulating *Klebsiella pneumoniae* NifL-dependent nitrogen control. **FEMS Microbiol Lett.**, Amsterdam, v. 180, p. 263-270, 1999.

ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 65 (1), p. 80-105, 2001.

ARSENE, F.; KAMISNKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 178, p. 4830-4838, 1996.

ATKINSON, M. R.; FISHER, S. H. Identification of genes and genes products whose expression is activated during nitrogen-limited growth in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 173, p. 23-27, 1991.

ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; WEISS, R. E.; NINFA, A. J. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, p. 28288-28293, 1994.

ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 29 (2), p. 431-447, 1998.

ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 32 (2), p. 301-313, 1999.

ATKINSON, M. R.; BLAUKAMP, T. A.; NINFA, A. J. Context-dependent functions of the PII and GlnK signal transduction proteins in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 184 (19), p. 5364-5375, 2002.

BALI, A.; BLANCO, G.; HILL, S.; KENNEDY, C. Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 58, p. 1711-1718, 1992.

BANAS, J. A.; RUSSEL, R. R.; FERRETI, J. J. Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. **Infect. Immun.**, Washington, v. 58, p. 667-673, 1990.

BARRET, J.; RAY, P.; SOBCZYK, A.; LITTLE, R.; DIXON, R. Concerted inhibition of the transcriptional activation functions of the enhancer-binding protein NifA by the anti-activator NifL. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 39 (2), p. 480-493, 2001.

BECKERS, G.; STRÖSSER, J.; HILDEBRANDT, U.; KALINOWSKI, J.; FARWICK, M.; KRÄMER, R.; BURKOVSKI, A. Regulation of AmtR-controlled gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: mechanism and characterization of the AmtR regulon. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 58, p. 580-595, 2005.

BELTSKY, B. R.; WRAY, L. V.; Jr, FISHER, S. H.; BOHANON, D. E.; SONENSHEIN, A. L. Role of TnrA in nitrogen source-dependent expression of *Bacillus subtilis* glutamate synthase gene expression. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 182, p. 5939-5947, 2000.

BELTSKY, B.R.; KIM, H.-J.; SONENSHEIN, A. L. CcpA-dependent regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase gene expression. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 186, p. 3392-3398, 2004.

BENELLI, E. M.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Evidence for two possible *glnB*-type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179 (14), p. 4623-4626, 1997.

BENELLI, Elaine Machado. Análise Estrutural e Funcional da Proteína PII, Controladora da Fixação de Nitrogênio em *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 1997. 200 f. Tese (doutorado em Ciências – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Uridylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Can. J. Microbiol.** Ottawa, v. 47 (4) p. 309-314, 2001.

BENELLI, E. M.; BUCK, M.; POLIKARPOV, I.; SOUZA, E. M.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O. *Herbaspirillum seropedicae* signal transduction protein PII is structurally similar to the enteric GlnK. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 269, p. 3296-3303, 2002.

BIRKHED, D.; ROSELL, K. G.; GARNATH, K. Structure of extracellular water-soluble polysaccharides synthesized from sucrose by oral strain of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, and *Actinomyces viscosus*. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 24, p. 53-61, 1979.

BLANCO, G.; DRUMMOND, M.; KENNEDY, C.; WOODLEY, P. Sequence and molecular analysis of the *nifL* gene of *Azotobacter vinelandii*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 9, p. 869-879, 1993.

BLAWKAMP, T. A.; NINFA, A. J. Nac-mediated repression of the *serA* promoter of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 45 (2), p. 351-363, 2002a.

- BLAWKAMP, T. A.; NINFA, A. J. Physiological role of the GlnK signal transduction protein of *Escherichia coli*: survival of nitrogen starvation. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 46(1), p. 203-214, 2002b.
- BLENCKE, H. M.; HOMUTH, G.; LUDWIG, H.; MÄDER, U.; HECKER, M.; STÜLKE, J. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metab. Eng.*, San Diego, v. 5, p. 133-149, 2003.
- BOHANNON, D. E.; SONENSHEIN, A. L. Positive regulation of glutamine biosynthesis in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 171, p. 4718-4727, 1989.
- BONATTO, A. C.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; BENELLI, E. M. Effect of T- and C-loop mutations on the *Herbaspirillum seropedicae* GlnB protein in nitrogen signalling. **Res. Microbiol.**, Washington, v. 156 (5-6), p. 634-640, 2005.
- BOS, R., H. C.; VAN DER MEI, J. M.; MEINDERS, BUSSCHER, H. J.. A quantitative method to study co-adhesion of microorganisms in a parallel plate flow chamber: basic principles of the analyses. **J. Microbiol. Methods.**, Amsterdam, v. 20, p. 289-305, 1994.
- BOTSFORD, J. L.; HARMAN, J. G. Cyclic AMP in prokariotes. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 56, p. 100-122, 1992.
- BOWDEN, G. H.; HARDIE, J. M.; SLACK, G. L. Microbial variations in approximal dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v. 9, p. 253-277, 1975.
- BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROWN, A. T.; WITTENBERGER, C. L. Mechanism for regulating the distribution of glucose carbon between the Embden-Meyerhof and hexose-monophaste pathways in *Streptococcus faecalis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 106, p. 456-467, 1971a.
- BROWN, A. T.; WITTENBERGER, C. L. The occurrence of multiple glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in cariogenic streptococci. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Amsterdam, v.43, p. 217-224., 1971 b.
- BROWN, S. W.; SONENSHEIN, A. L. Autogenous regulation of the *Bacillus subtilis* *glnRA* operon. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 178 (8), p. 2450-2454, 1996.
- BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 164 (2), p. 816-822, 1985.

BURNE, R. A.; SCHILLING, K.; BOWEN, W. H.; YASBIN, R. E.; Expression, purification, and characterization of an exo- β -D-fructosidase of *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.169, p.4507-4517, 1987.

BURNE, R. A. Oral ecological disasters: the role of short-term extracellular storage polysaccharides. In: BOWEN, W. H. And TABAK, L. A. (Ed.). **Cariology for the Nineties**. Rochester, University of Rochester Press, 1991. p. 351-364.

BURNE, R. A. Oral streptococci...products of their environment. **J. Dent Res.**, Washington, v,77, p. 445-452, 1998.

BUSHER, H. J.; VAN DER MEI, H. C. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 11, p. 24, 1997.

BUSHER, H. J.; VAN DER MEI, H. C. Initial microbial adhesion events: mechanisms and implications. **Community Structure and Co-operation in Biofilms**, London, v.59, p. 25-36, 2000.

CALDOVIC, L.; TUCHMAN, M. N-acetylglutamate and its changing role through evolution. **Biochem. J.**, London, v. 372, p. 279-290, 2003.

CAMACHO, A.; SALAS, M. Effect of mutations in the extended 10' motif of three *Bacillus subtilis* sigma A-RNA polymerase-dependent promoters. **J. Mol. Biol.**, London, v. 286, p. 683-693, 1999.

CARLBERG, I.; NORDLUND, S. Purification and partial characterization of glutamate synthase from *Rhodospirillum rubrum* grown under nitrogen-fixing conditions. **Biochem. J.**, London, v. 279, p. 151-154, 1991.

CARLSSON, J.; KUJALA, U.; EDLUND, M. Pyruvate dehydrogenase activity in *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 49, p. 674-678, 1985.

CARR, P. D.; CHEAH, E.; SUFFOLK, P. M.; VASUDEVAN, S. G.; DIXON, N. E.; OLLIS, D. L. X-ray structure of the signal transduction protein from *Escherichia coli* at 1.9 Å. **Acta Crystallogr. sect. D Biol. Crystallogr.**, Copenhagen, v. 52, p. 93-104, 1996.

CHEN, S.; LIU, L; ZHOU, X.; ELMERICH, C.; LI, L. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr→Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Mol. Genet. Genomics**, San Diego, v. 273 (5), p. 415-422, 2005.

CHENG, J.; JOHANSSON, M.; NORDLUND, S. Expression of P_{II} and glutamine synthetase is regulated by P_{II}, the *ntrBC* products, and processing of the *glnBA* mRNA in *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 181, p. 6530-6534, 1999.

- CHIEN, Y. T.; ZINDER, S.H. Cloning, functional organization, transcrip studies, and phylogenetic analysis of the complete nitrogenase structural genes (*nifHDK2*) and associated genes in the archaeon *Methanosarcina barkeri* 227. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 178, p. 143-148, 1996.
- CLARK, J. K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. **Br. J. Exp. Path.**, London, v. 5, p. 141-147, 1924.
- COHEN-KUPIEC, R.; ZILBERSTEIN, A.; GUREVITZ, M. Characterization of *cis* elements that regulate the expression of *glnA* in *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 177, p. 2222-2226, 1995.
- COLIGAN, J. E, DUNN, B. M.; PLOEGH, H.L.; SPEICHEIR, W. D.; WINGFIELD, P. T. (Ed). **Current Protocols in Protein Science Online** Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.
- COLNAGHI, R.; RUDNICK, P.; HE, L.; GREEN, A.; LARSON, E.; KENNEDY, C. Lethality of *glnD* null mutations in *Azotobacter vinelandii* glutamine synthetase adenylation. **Microbiology**, Reading, v. 147, p. 1267-1276, 2001.
- COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT. Microbial biofilms. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 49, p. 711-745, 1995.
- COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D.; MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **EMBO J.**, Oxford, v. 21 (4), p. 536-545, 2002.
- COWAN, N. M.; TAYLOR, L. L.; DOYLE, R. J. Role os sialic acid in the knetics of *Streptococcus sanguis* adhesion to artificial pellicle. **Infect. Immun.**, Washington, v. 55, p. 1552-1557, 1987.
- COYKENDALL, A. L.; DALLY, O. P.; KRAMER, M. J.; BEATH, M. E. DNA-DNA hybridization studies of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 50, p. 1131-1139, 1971.
- COYKENDALL, A. L. Proposal to elevate the subspecies of *Streptococcus mutans* to species status based on their molecular composition. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.27(1), p. 26-30, 1977.
- COYKENDALL, A.L. Classification and identification of the viridans streptococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.2, p.315-328, 1989.
- CVITKOVITCH, D. G.; GUTIERREZ, J. A.; BLEIWEIS, A. S. Role of citrate pathway in glutamate biosynthesis by *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179 (3), p. 650-655, 1997.

CVITKOVITCH, D. G.; GUTIERREZ, J. A.; BEHARI, J.; YOUNGMAN, P. J.; WETZ, J. E. JR.; CROWLEY, P. J.; HILLMAN, J. D.; BRADY, L. J.; BLEIWEIS, A. S. Tn917-lac mutagenesis of *Streptococcus mutans* to identify environmentally regulated genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 182, p. 149-154, 2000.

CVITKOVITCH, D. G.; YUNG-HUA, L.; ELLEN, R. P. Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. **J. Clin. Invest.**, Washington, v. 112 (11), p. 1626-1632, 2003.

DAHLQUIST, F. W.; PURICH, D. L. Regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Evidence for the action of some feedback modifiers at the active site of the unadenylylated enzyme. **Biochemistry**, Washinton, v. 14 (9), p. 1980-1989, 1975.

DASHPER, S. G.; REYNOLDS, E. C. Branched-chain amino acid transport in *Streptococcus mutans* Ingbritt. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 8 (3), p. 167-171, 1993.

DASHPER, S. G.; RILEY, P. F.; REYNOLDS, E. C. Characterization of glutamine transport in *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 10, p. 183-187, 1995.

DAWES, C. An analysis of factors influencing diffusion from dental plaque into a moving film of saliva and the implications for caries. **J. Dent. Res.**, Washington, v.68, p. 1483-1488, 1989.

DEAN, R. D.; BOLIN, J. T.; ZHENG, L. Nitrogenase metalloclusters: structure, organization and synthesis. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, p. 6737-6744, 1993.

DETSCH C.; STÜLKE, J. Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. **Microbiology**, Reading, v. 149, p. 3289-3297, 2003.

DEUEL, T. F.; STADTMAN, E. R. Some kinetic properties of *Bacillus subtilis* glutamyl synthetase. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 245, p. 5206-5213, 1970.

DEUTSCHER, M. P. Rethinking your purification procedure. **Methods Enzymol.**, San Diego, v. 182, p. 779-780, 1990.

de ZAMAROCZY, M.; DELORME, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum brasilense*. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 224, p. 421-430, 1990.

de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, p. 2507-2515, 1993.

de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII proteins in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 178, (14), p. 4143-4149, 1996.

de ZAMAROCZY, M. Structural homologues PII and PZ of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 29 (2), p. 449-463, 1998.

DIXON, R.; KENNEDY, C.; KONDOROSI, A.; KRISHNAPILLAI, V.; MERRICK, M. Complementation analysis of *Klebsiella pneumoniae* mutants defective in nitrogen fixation. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 157, p. 189-198, 1977.

DOREL, C.; VIDAL, O.; PRINGENT-COMBARET, C.; VALLET, I.; LEUJENE, P. Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 178 (1), p. 169-175, 1999.

DRUMMOND, M. H.; WOOTTON, J. C. Sequence of *nifL* from *Klebsiella pneumoniae*: mode of action and relationship to two families of regulatory proteins. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 1, p. 37-44, 1987.

DUAN, Y.; FISHER, D.; MALAMUD, D.; GOLUB, E.; DEMUTH, D.; Calcium-binding properties of SSP-5, the *Streptococcus gordonii* M5 receptor for salivary agglutinin. **Infect. Immun.**, Washington, v. 62, p. 5220-5226, 1994.

EADY, R. R. Enzymology of free-living diazotrophs. In: BROUGHTON, W. J. and PUHLER, A. (Ed.). **Nitrogen Fixation**. Oxford: Clarendon Press, 1986. v. 4, p. 1-49.

EDGAR, W. M.; O'MULLANE, D. M. Saliva and dental health. **Br. Dent. J.**, London, 1996.

EHLERS, C.; GRABBE, R.; VEIT, K.; SCHMITZ, R. A. Characterization of GlnK₁ from *Methanosarcina mazei* strain Gö1: complementation of an *Escherichia coli* *glnK* mutant strain by GlnK₁. **J. Bacteriol.**, Washington, v 184, p. 1028-1040, 2002.

EHLERS, C.; WEIDENBACH, K.; VEIT, K.; FORCHHAMMER, K.; SCHMITZ, R. A. Unique mechanistic features of post-translational regulation of glutamine synthetase in *Methanosarcina mazei* strain Gö1 in response to nitrogen availability. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 55(6), p. 1841-1854, 2005.

ENGLEMAN, E. G.; FRANCIS, S. H. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. II. Metabolite regulation of the enzymes in the cascade. **Arch. Biochem. Biophys.**, Orlando, v. 191, p. 602-612, 1978.

FADEL-PICHETH, C. M.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Regulation of *Azospirillum brasilense* *nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 179, n. 2, p. 281-288, 1999.

FAIRES, N.; TOBISCH, S.; BACHEM, S.; MARTIN-VESTRAETE, I.; HECKER, M.; STÜLKE, J. The catabolite repression protein CcpA controls ammonium assimilation in *Bacillus subtilis*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, Basel, v. 1, p. 141-148, 1999.

FARNHAM, P. J.; PLATT, T. Rho-independent termination: dyad symmetry in DNA causes RNA polymerase to pause during transcription *in vitro*. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 9, p. 563-577, 1981.

FEJERSKOV, O.; THYLSTRUP, A. Diferentes conceitos sobre a cárie dentária e suas implicações. *In*: THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica**. 3.ed. São Paulo, Ed. Santos, 2001. Cap. 9, p.209-217.

FERSON, A. E.; WRAY, L. V.; FISHER, S. H. Expression of the *Bacillus subtilis* *gabP* gene is regulated independently in response to nitrogen and amino acid availability. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 22 (4), p. 693-701, 1996.

FINK, D.; FALKE, D.; WOHLLEBEN, W.; ENGELS, A. Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2): modification of glutamine synthetase I by adenylyltransferase. **Microbiology**, Reading, v. 145, p. 2313-2322, 1999.

FINK, D.; WEIBSCHUH, N.; REUTHER, J.; ENGELS, A. Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 46, p. 331-347, 2002..

FISHER, S. H.; SONENSHEIN, A. L. *Bacillus subtilis* glutamine synthetase mutants pleiotropically altered in glucose catabolite repression. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 157, p. 612-621, 1984.

FISHER, S. H.; SONENSHEIN, A. L. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. **Ann. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 45, p. 107-135, 1991.

FISHER, S. H. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 32, p. 223-232, 1999.

FISHER, S. H.; DÉBARBOUILLÉ, M. Nitrogen source utilization and its regulation in *Bacillus subtilis* and its closest relatives. *In*: SONENSHEIN, A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK, R. (Ed.). **Genes to Cells**. Washington DC: American Society for Microbiology, 2002, p. 181-191.

FLORES, E.; MURO-PASTOR, M.; HERRERO, A. Cyanobacterial nitrogen assimilation genes and NtcA-dependent control of gene expression. *In*: PESCHEK, G. A.; LÖFFELHARDT, W.; SCHMETTERER, G. (Ed.). **The Phototrophic Prokaryotes**. Plenum: New York, p. 463-477, 1999.

FORCHHAMMER, K.; TANDEAU DE MARSAC, N. The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 176 (1), p. 84-91, 1994.

FORCHHAMMER, K.; TANDEAU DE MARSAC, N. Functional analysis of the phosphoprotein PII (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 177 (8), p. 2033-2040, 1995a.

FORCHHAMMER, K.; TANDEAU DE MARSAC, N. Phosphorylation of the PII (*glnB* gene product in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: analysis of in vitro kinase activity. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 177 (20), p. 5812-5817, 1995b.

FORCHHAMMER, K.; HEDLER, A.; STROBEL, H.; WEISS, V. Heterotimerization of PII-like signalling proteins: implications for PII-mediated signal transduction systems. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 33 (2), p. 338-349, 1999.

FORCHHAMMER, K.; MAHESWARAN, M. Carbon-source-dependent nitrogen regulation in *Escherichia coli* is mediated through glutamine-dependent GlnB signalling. **Microbiology**, Reading, v. 149, p. 2163-2172, 2003.

FOX, S. **Medical Microbiology**. 3. ed. Reading, 1999.

GIBBONS, R. J.; VAN HOUTE, J. Bacterial adherence and the formation of dental plaques. In: BEACHEY, E. H. (Ed.). **Bacterial Adherence**. London: Chapman & Hall, 1980. p. 63-104.

GIBBONS, R. J.; RAY, D. J. Adsorbed salivary proline-rich proteins as bacterial receptors on apatitic surfaces. **Mol. Mechan. Microb. Adh.**, New York, p. 143-163, 1988.

GIBBONS, R. J.; RAY, D. J.; SCHLESINGER, D. H.; Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. **Infect. Immun.**, Washington, v.59, p. 2948-2954, 1991.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V; van HOUTE, J. A selective medium for the isolation of *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.**, Nova York, v. 18, p. 1357-1364, 1973.

GOLD, W.; PRESTON, F. B.; LACHE, M. C.; BLECHMAN, H. Production of levan and dextran in dental plaque *in vivo*. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 53, p. 442-449, 1974.

GOTTSCHALK, G. **Bacterial metabolism**. Springer-Verlag, New York, 1986.

GRIFFITH, C. J.; CARLSSON, J. Mechanism of ammonia assimilation in streptococci. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 82, p. 253-260, 1974.

GUTOWSKI, J. C.; SCHREIER, H. J.; Interaction of the *Bacillus subtilis* *glnRA* repressor with operatos and promoter sequences *in vivo*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 173 (3), p. 671-681, 1992.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly-biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl Acids Symp. Ser.**, Baltimore, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMADA, S.; KOGA, T.; OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 63, p. 407-411, 1984.

HANSON, T. E.; ANDERSON, R.L. Phosphoenolpyruvate-dependent formation of D-fructose 1-phosphate by a four component phosphotransferase-system. **Biochemistry**, Washington, v. 61, p. 269-276, 1968.

HARRISON, M. A.; KEEN, N. J.; FINLAY, B. C.; ALLEN, J. F. Modification of a *glnB* like gene product by photosynthetic electron transport in cyanobacterium *Synechococcus* 6301. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 264, p. 25-28, 1990.

HE, L.; SOUPENE, E.; KUSTU, S. NtrC is required for control of *Klebsiella pneumoniae* NifL activity. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179, p. 7446-7455, 1997.

HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, A.; KUSTU, S. Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, p. 6661-6667, 1998.

HERRERO, A.; MURO-PASTOR, A. MURO-PASTOR, A. M.; FLORES, E. Nitrogen control in cyanobacteria. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 183, p. 411-425, 2001.

HESKETH, A.; FINK, D.; GUST, B.; REXER, H.-U. S.; SCHEEL, B.; CHATER, K.; WOHLLEBEN, W.; ENGELS, A. The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 2, p. 319-330, 2002.

HIGUCHI, M.; IWANI, Y.; YAMADA, T.; ARAYA, S. Levan synthesis and accumulation by human dental plaque. **Arch. Oral Biol.**, Amestardan, v. 15, p. 563-567, 1970.

HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; DIXON, R. *Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 93, p. 2143-2148, 1996.

HOLDE, M. T.; CHHABRA, S. R.; de NYS, R.; STEAD, P.; BAITON, N. J.; HILL, P. E. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 33 (6), p.1254-1266, 1999.

HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1994.

HUERGO, F. L.; SOUZA, E. M.; ARAÚJO, M. S.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; STEFFENS, M. B. R.; MERRICK, M. ADP-ribosylation of dinitrogenase reductase in *Azospirillum brasilense* is regulated by AmtB-dependent membrane sequestration of DRAG. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 59, p. 326-337, 2006.

HUNT, T. P.; MAGASANIK, B. Transcription of *glnA* by purified *Escherichia coli* components: core RNA polymerase and the products of *glnF*, *glnG*, and *glnL*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 82 (24), p. 8453-8457, 1985.

IRMLER, A.; SANNER, S.; DIERKS, H.; FORCHHAMMER, K. Dephosphorylation of the phosphoprotein PII in *Synechococcus* PCC7942: identification of an ATP and 2-oxoglutarate-regulated phosphate activity. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 26, p. 81-90, 1997.

IRMLER, A.; FORCHHAMMER, K. A PP2C-type phosphatase dephosphorylates the PII signaling protein in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. **Proc. Natl. Acad. USA**, Washington, v. 98, p. 12978-12983, 2001.

JACK, R.; de ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* gene expression in *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 181 (4), p. 1156-1162, 1999.

JAGGI, R.; van HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H.; OLLIS, D. L.; VASUDEVAN, S. G. The two opposing activities of adenylyl transferase reside distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. **EMBO J.**, Oxford, v. 16 (18), p. 5562-5571, 1997.

JAKOBY, M.; KRÄMER, R.; BURKOVSKI, A. Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: isolation of genes involved and biochemical characterization of corresponding proteins. **FEMMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.173, p. 303-310, 1999.

JAKOBY, M.; NOLDEN, L.; MEIER-WAGNER, J.; KRAMER, R.; BURKOVSKI, A. AmtR, a global repressor in the nitrogen regulation system of *Corynebacterium glutamicum*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 37, p. 964-977, 2000.

JAVELLE, A.; SEVERI, E.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 279, p. 8530-8538, 2004.

JENKINSON, H. F.; LAMONT, R.J. Streptococcal adhesion and colonization. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Washington, v. 8, p. 175-200, 1997.

JIANG, P.; ZUCKER, P.; ATKINSON, M.; KAMBEROV, M. S.; TIRASOPHON, W.; CHANDRAN, P.; SCHEFKE, B. R.; NINFA, A. J. Structure/function analysis of the PII signal transduction protein of *Escherichia coli*: genetic separation of interactions with protein receptors. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179 (3), p. 4342-4353, 1997.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. **Biochemistry**, Washington, v. 37, p. 12782-12794, 1998a.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Reconstitution of the signal-transduction bicyclic cascade responsible for the regulation of the *ntr* gene transcription in *Escherichia coli*. **Biochemistry**, Washington, v. 37, p. 12795-12801, 1998b.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylation state. **Biochemistry**, Washington, v. 37, p. 12802-12810, 1998c.

JIANG, P.; NINFA, A. J. Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 181, p. 1906-1911, 1999.

JOHANSSON, M.; NORDLUND, S. Transcription of the *glnB* and *glnA* genes in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Microbiology**, Reading, v. 142, p. 1265-1272, 1996.

JOSHI, H. M.; TABITA, F. R. A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 93, p. 14515-14520, 1996.

KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R.; FENG, J.; CHANDRAN, P.; NINFA, A. J. Sensory components controlling bacterial nitrogen assimilation. **Cell. Mol. Biol. Res.**, Tarrytown, v. 40, p. 175-191, 1994.

KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. The *Escherichia* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. **J. Biol. Chem.**, Washington, v. 270, p. 17797-17807, 1995.

KHADEMI, S.; O'CONNELL, J.; REMIS, J.; ROBLES-COLMENARES, Y.; MIERICKE, L. J. W.; STROUD, R. M.; Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. **Science**, Washington v. 305, p. 1587-1594, 2004.

KESSLER, P. S.; BANK, C.; LEIGH, J. A. The *nif* gene operon of the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, p. 1504-1511, 1998.

KESSLER, P. S.; DANIEL, C.; LEIGH, J. A. Ammonia switch-off of nitrogen fixation in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*: mechanistic features and requirement for the novel GlnB homologues, Nifl₁ and Nifl₂. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 183, p. 882-889, 2001.

KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L.U. Sequence and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 181, p. 165-170, 1999.

KLOSE, K. E.; WEISS, D. S.; KUSTU, S. Glutamate at the site of phosphorylation of nitrogen-regulatory protein NtrC mimics aspartyl-phosphate and activates the protein. **J. Mol. Biol.**, London, v. 232, p. 67-78, 1993.

KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **J. Bacteriol.**, Bethesda, v. 175, p. 3247-3252, 1993.

KOLENBRANDER, P. E. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and ecology of dental plaque. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 42, p. 627-656, 1998.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 54, p. 413-437, 2000.

KUSTU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of σ^{54} (*ntrA*)-dependent genes is probably united by a common mechanism. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 53 (3), p. 367-376, 1989.

LAEMMLI, U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T7. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. Adhesion as an ecological determinant in the oral cavity. In: KURAMITSU, H. K. and ELLEN, R. P. (Ed.). **Oral Bacterial Ecology: the Molecular Basis**. Wymondham, Horizon Scientific Press, 2000, p. 131-168.

LEE, H.-M.; FLORES, E.; HERRERO, A.; HOUMARD, J.; TANDEAU de MARSAC, N. A role for the signal transduction protein P_{II} in the control of nitrate/nitrite in a cyanobacterium. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 427, p. 291-295, 1998.

LEE, H.-M.; FLORES, E.; FORCHHAMMER, K.; HERRERO, A.; TANDEAU de MARSAC, N. Phosphorylation of the signal transducer P_{II} protein and an additional effector are required for the P_{II}-mediated regulation of nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 267, p. 591-600, 2000.

LI, Y. H.; BOWDEN, G. H. Characteristics of accumulation of oral gram-positive bacteria on mucin-conditioned glass surfaces in a model system. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen., v. 9, p. 1-11, 1994.

LIANG, Y. Y.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. **Mol Microbiol.**, Oxford, v. 5, p. 2735-2744, 1991.

LIANG, Y. Y., DE ZAMAROCZY, M., ARSENE, F., PAQUELIN, A., ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. **FEMS Microbiol Lett**, v. 79, p. 113 – 119, 1992.

LIANG, Y. Y.; ARSENE, F.; ELMERICH, C. Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* Sp7: their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 240, p. 188-196, 1993.

LIAN, S. H.; VILLAFRANCA, J. J.; EISENBERG, D. A model for oxidative modification of glutamine synthetase, based on crystal structures of mutant H269N and the oxidized enzyme. **Biochemistry**, Washington, v. 32(31), p. 7999-8003, 1993.

- LITTLE, R.; REYES-RAMIREZ, F.; ZHANG, Y.; van HEEWIJK, W. C.; DIXON, R. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. **EMBO J.**, Oxford, v. 19, p. 6041-6050, 2000.
- LIU, J.; MAGASANIK, B. Activation of the dephosphorylation of nitrogen regulator I-phosphate of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 177, p. 926-931, 1995.
- LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Regulation of nitrogenase activity by reversible ADP ribosylation. **Curr. Top. Cell Regul.**, New York, v. 30, p. 23-56, 1989.
- MACHADO, I. M.; YATES, M. G.; MACHADO, H. B.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. ing and sequence of the nitrogenase structural genes *nifHDK* of *Herbaspirillum seropedicae*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 1599-1602, 1996.
- MAGASANIK, B. The regulation of nitrogen utilization in enteric bacteria. **J. Cell Biochem.**, Tokyo, v. 51, p. 34-40, 1993.
- MAHESWARAN, M.; URBANKER, C.; FROCHHAMMER, K. Complex formation and catalytic activation by the P_{II} signaling protein of N-acetyl-L-glutamate kinase from *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. **J. Biol. Chem.**, Washington, v. 279, p. 55202-55210, 2004.
- MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; McCARVIL, J.; FEAVERS, I. M. Identification of meningococcal serosubtypes by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 30 (11), p. 2835-2841, 1992.
- MALONEY, P. C. Bacterial transporters. **Curr. Opin. Cell Biol.**, Amsterdam, v. 6, p. 571-582, 1994.
- MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 8, p. 263, 1994.
- MARSH, P. D. Dental plaque. In: LAPPIN-SCOTT, H. M and COSTERTON, J. W. (Ed.). **Bacterial Biofilms**. Cambridge, Cambridge University Press, 1995. p.282.
- MARSH, P. D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. **Cariology**, Salisbury, v.43, p. 599-614, 1999.
- MARTIN, E. J. ST.; WITTENBERGER, C. L. Regulation and function of ammonia-assimilating enzymes in *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 28, p. 220-224, 1980.
- MASEPOHL, B.; KREY, R.; KLIPP, W. The *draTG* gene region of *Rhodabacter capsulatus* is required for post-translational regulation of both the molybdenum and the alternative nitrogenase. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 139, p. 2667-2675, 1993.

- MATTOS-GRANER, R. O.; JIN, S.; KING, W. F.; CHEN, T.; SMITH, D. J.; DUNCAN, M. J. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. **Infect. Immun.**, Washington, v. 69, p. 6931-6941, 2001.
- MELETZUS, D.; RUDNICK, P.; DOETSCH, N.; GREEN, A.; KENNEDY, C. Characterization of the *glnK-amtB* operon of *Azotobacter vinelandii*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180 (12), p. 3260-3264, 1998.
- MERRICK, M.J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiol Rev.**, Washinton, v.59 (4), p. 604-622, 1995.
- MOBLEY, C. C. Nutrition and dental caries. **Dent Clin North Am.**, Philadelphia, v. 47, p. 319-336, 2003.
- MORETT, E.; SEGOVIA, L. The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action of phylogenetic relationship of their functional domais. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175 (19), p. 6067-6074, 1993..
- MUNRO, C.; MICHALEK, S. M.; MACRINA, F. L. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange. **Infect. Immun.**, Washington, v. 59, p. 2316-2323, 1991.
- NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J. L.; SCHACCHTER, M. **Physiology of the bacterial cell**. Sunderland: Sinauer Associates, 1990.
- NINFA, A. J.; MAGASANICK, B. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, V. 83(16), p. 5909-5913, 1986.
- NINFA, A. J.; ATKINSON, M. R.; KAMBEROV, E. S.; FENG, J.; NINFA, E. G. Control of the nitrogen assimilation by the NR_I-NR_{II} two component system of enteric bacteria. In: HOCH, J. A.; SILHAVY, T. J. (Ed.). **Two-component signal transduction**. Washington: ASM Press, 1995. p. 67-88.
- NINFA, A. J.; ATKINSON, M.R. PII signal transduction proteins. **Trends Microbiol.**, Limerick, v.8 (4), p. 172-179, 2000.
- NYVAD, B.; M. KILIAN. Microbiology of the early colonizers of human enamel and root surfaces in vivo. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 95, p. 369-380, 1987.
- NOINDORF, Lilian. Clonagem, seqüenciamento e caracterização dos genes *glnK* e *amtB* de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2002. 102 f. Dissertação (mestrado em ciências – Bioquímica). Setor de Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NOINDORF, L.; REGO, F. G. M.; BAURA, V. A.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L. M.; RIGO, L. U.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Arch. Microbiol.**, Berlin, v. 6, p. 1-8, 2005.

NOJI, S.; SATO, Y.; SUZUKI, R.; TANIGUCHI, S. Effect of intracellular pH and potassium ions on a primary transport system for glutamate/aspartate in *Streptococcus mutans*. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 175, p. 491-495, 1988.

OOSHIMA, T.; MATSUMURA, M.; HOSHINO, T.; KAWABATA, S.; SOBUE, S.; FUJIWARA, S. Contributions of three glucosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 80, p. 1672-1677, 2001.

OPHIR, T.; GUTNICK, D. L. A role for exopolysaccharide in the protection of microorganisms from desiccation. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington v. 60, p. 740-745, 1994.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.54, p. 49-79, 2000.

PAHEL, G.; ROTHSTEIN, D. M.; MAGASANIK, B. Complex *glnA-glnL-glnG* operon of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 150, p. 202-213, 1982.

PARKER, M. T.; BALL, L. C. Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man. **J. Med. Microbiol.**, Reading, v. 9 (3) p. 275-302, 1976.

PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 97, p. 8789-8793, 2000.

PASTAN, I.; ADHYA, S. Cyclic adenosine 5'-monophosphate in *Escherichia coli*. **Bacteriol. Rev.**, Berkeley, v. 40, p. 527-551, 1976.

PAZ-YEPES, J.; FLORES, E.; HERRERO, A. Transcriptional effects of the signal transduction protein P_{II} (*glnB* gene product) on NtcA-dependent genes in *Synechococcus* sp. PCC7942. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 543, p. 42-46, 2003.

PEDROSA, F. O.; TEIXEIRA, K. R. S.; MACHADO, I. M. P.; STEFFENS, M. B. R.; KLASSEN, M. G.; BENELLI, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; ISHIDA, M. L.; YATES, M. G.; SOUZA, E. M. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. **Soil Biol. Biochem.**, Kidlington, v. 29, p. 843-846, 1997.

PEDROSA, F. O.; BENNELI, E. M.; YATE, M. G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEM, G.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. U. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 91, p. 189-195, 2001.

PERSUHN, D. C.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. **FEMS Microbil. Lett.**, Amsterdam, v. 192, p. 217-221, 2000.

PIOSZAK, A. A.; JIANG, P.; NINFA, A. J. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates the activities of the two-component system transmitter protein NRII by direct interaction with the kinase domain of the transmitter module. **Biochemistry**, Washington, v. 39, p. 13450-13461, 2000.

POSTGATE, J. R. **Nitrogen fixation**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1998.

QUIAN, Y.; TABITA, F. R. A global signal transduction system regulates aerobic and anaerobic CO₂ fixation in *Rhodobacter sphaeroids*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 178, p. 12-18, 1996.

QUIAN, Y.; TABITA, F. R. Expression of *glnB* and a *glnB*-like gene (*glnK*) in a ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroids*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, p. 4644-4649, 1998.

QUIVEY, R. G.; KUHNERT, W. L.; HAHN, K. Genetics of acid adaptation in oral streptococci. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Boca Raton, v. 12, p. 301-314, 2001.

RATNAYAKE-LECAMWASAM, M. P.; SERROR, P.; WONG, K. W.; SONENSHEIN, A. L. *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. **Genes Dev.**, Nova York, v. 15, p. 1093-1103, 2001.

RAWN, D. J. In: **Biochemistry**, Neil Patterson Publishers, Burlington, NC, p. 379-406, 1989.

REEDER, J.C.; WESTWELL, A.J.; HUTCHINSON, D. N. Indifferent streptococci in normal and purulent eyes of neonates. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 38 (8) p. 942-945, 1985.

REITZER, L. J. Sources of nitrogen and their utilization. In: NEIDHARDT, F. C.; CURTIS, III, R.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E. C.C .C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B. (Ed.). **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology**. Washington: ASM Press, 1996a. p. 380-390.

REITZER, L. J. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate. Aspartate, asparaginase, L-alanine, and D-alanine. In: NEIDHARDT, F. C.; CURTIS, III, R.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E. C.C .C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B. (Ed.). **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology**. Washington: ASM Press, 1996b. p. 391-407.

RHEE, S. G.; CHOCK, P. B.; STADTMAN, E. R. Glutamine synthetase from *Escherichia coli*. **Methods Enzymol.**, San Diego, v.113, p. 213-241, 1985.

RHEE, S. G.; CHOCK, P. B.; STADTMAN, E. R. Regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.**, New York, v.62, p. 37-92, 1989.

ROLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. **J. Dent. Res.**, Bethesda, v. 97, p. 115-119, 1989.

RUDNICK, P.; MELETZUS, D.; GREEN, L.; KENNEDY, C. Regulation of nitrogen fixation by ammonium in diazotrophic species of *Proteobacteria*. **Soil Biol. Biochem.**, Kidlington, v. 29, p. 831-842, 1997.

RUSSELL, R. R.; COLEMAN, D.; DOUGAN, G. Expression of a gene for glucan-binding protein from *Streptococcus mutans* in *Escherichia coli*. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 131, p. 295-299, 1985.

RUSSELL, R. R.; ADUSE-OPOKU, J.; SUTELIFFE, L. C.; TAO, L.; FERRETTI, J.J. A binding protein-dependent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 267, p. 4631-4637, 1992.

SAKAI, H.; WANG, H.; TAKEMOTO-HORI, C.; KAMINISHI, T.; YAMAGUCHI, H.; KAMEWARI, Y.; TERADA, T.; KURAMITSU, S.; SHIROUZO, M.; YOKOYAMA, S. Crystal structure of the signal transducing protein GlnK from *Thermus thermophilus* HB8. **J. Struct. Biol.**, San Diego, v. 149 (1), p. 99-110, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDERS, C. E.; MELIS, A.; ALLEN, J. F.; In vivo phosphorylation of proteins in the cyanobacterium *Synechococcus* 6301 after chromatic acclimation to photosystem II light. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 976, p. 168-172, 1989.

SANDERS, D. A.; GILLECE-CASTRO, B. L.; BURLINGAME, A. L.; KOSHLAND, D. E. Phosphorylation site of NtrC, a protein phosphatase whose covalente intermediate activates transcription. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 174, p. 5117-5122, 1992.

SATO, Y.; YAMAMOTO, Y.; SUZUKI, R. Effect of potassium ions on lactate production and growth of *Streptococcus mutans* in relationship to the proton motive force. **Bull. Tokyo Dent. Coll.**, Tokyo, v. 28, p. 99-110, 1987.

SATO, Y.; NOJI, S.; SUZUKI, R.; TANIGUCHI, S. Dual mechanism for stimulation of glutamate transporte by potassium ions in *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 171 (9), p. 4963-4966, 1989.

SCANNAPIECO, F. A. Saliva-bacterium interactions in oral microbiol ecology. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Boca Raton, v.5, p. 203-248, 1994.

SCANNAPIECO, F. A.; TORRES, G. I.; LEVINE, M. J. Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxiapatite. **J. Dent. Res.**, Washington, v.74, p. 1360-1366, 1995.

SHIVERS, R. P.; SONENSHEIN, A. L. Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 5, p. 599-611, 2004.

SCHMITZ, R. A. NifL of *Klebsiella pneumoniae* carries an N-terminally bound FAD cofactor, which is not directly required for the inhibitory function of NifL. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 157, p. 313-318, 1997.

SCHREIER, H. J.; BROWN, S. W.; HIRSCHI, K. D.; NOMELLINI, J. F.; SONENSHEIN, A. L.; Regulation of the *Bacillus subtilis* glutamine synthetase gene expression by the product of the *glnR* gene. **J. Mol. Biol.**, Oxford, v. 210, p. 51-63, 1989.

SCHWAB, Stefan. Caracterização parcial dos elementos em *cis* responsáveis pela expressão do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2002. 113f. Dissertação (mestrado em Ciência – Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SCHWARZENBACHER R.; von DELFT, F.; ABDUBEK, P.; AMBING, E.; BIORAC, T.; BRINEN, L. S.; CANAVES, J. M.; CAMBELL, J.; CHIU, H. J.; DAI, X.; DEACON, A. M.; DiDONATO, M.; ELSLIGER, M. A.; ESHAG, S.; FLOYD, R.; GODZIK, A.; GRITTINI, C.; GRZECHNIK, S. K.; HAMPTON, E.; JAROSZEWSKI, L.; KARLAK, C.; KLOCK, H. E.; KOESEMA, E.; KOVARIK, J. S.; KREUSCH, A.; KUHN, P.; LESLEY, S. A.; LEVIN, I.; McMULLAN, D.; McPHILLIPS, T. M.; MILLER, M. D.; MORSE, A.; MOY, K.; OUYANG, J.; PAGE, R.; QUIJANO, K.; ROBB, A.; SPRAGGON, G.; STEVENS, R. C.; van den BEDEM, H.; VELASQUEZ, J.; VINCENT, J.; WANG, X.; WEST, B.; WOLF, G.; XU, Q.; HODGSON, K. O.; WOOLEY, J.; WILSON, I. A. Crystal structure of a putative PII-like signaling protein (TM0021) from *Thermotoga maritima* at 2.4 Å resolution. **Proteins**, New York, v.54 (4), p. 810-813, 2004.

SIEWE, R. M.; WEIL, B.; BURKOVSKI, A.; EIKMANNS, B. J.; EIKMANNS, M.; KRÄMER, R. Functional and genetic characterization of the (methyl) ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, p. 5398-5409, 1996.

SILBERBACH, M.; SCHÄFFER, M.; HÜSER, A. T.; KALINOWSKI, J.; PÜHLER, A.; KRÄMER, R.; BURKOVSKI, A. Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to ammonium limitation: a global analysis using transcriptome and proteome techniques. **Appl. Envir. Microbiol.**, Washington, v. 71, p. 2391-2402, 2005.

SLACK, F. J.; SERROR, P.; JOYCE, E.; SONENSHEIN, A. L. A gene required for nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 15, p. 689-702, 1995.

SMITH, D. J.; AKITA, H.; KING, W. F.; TAUBMAN, M. A. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 62, 2545-2552, 1994.

SON, H. S.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. Purification and properties of PII protein and nucleotide sequence of its structural gene. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.262, p. 8690-8695, 1987.

SOUILLARD, N.; SIBOLD, L. Primary structure, functional organization and expression of nitrogenase structural genes of the thermophilic archaeobacterium *Methanococcus thermolithotrophicus*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 3, p. 541-551, 1989.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F. O. Cloning and characterization of the *nifA* gene from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 37, p. 425-429, 1991a.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. Sequence and structural organization of a *nifA*-like gene and part of a *nifB*-like gene of *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 137, p. 1511-1522, 1991b.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L. U.; YATES, M. G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 181, p. 681-684, 1999.

SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; RIGO, L. U.; MACHADO, H. B.; YATES, M. G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and of the -24/-12 promoter element. **Microbiology**, Reading, v. 146, p. 1407-1418, 2000.

STADTMAN, E. R.; GINSBURG, A.; CIARD, J. E.; YEH, J.; HENNING, S. B.; SAHPIRO, B. M. Multiple molecular form of glutamine synthetase produced by enzyme catalysed adenylation and deadenylation reaction. **Adv. Enzyme Regul.**, Kidlington, v. 8, p. 99-118, 1970.

STEPHAN, R. M. Changes in hydrogen-ion concentration on tooth surface and in carious lesions. **J. Am. Dent. Assoc.**, Oxford, v. 27, p. 718-723, 1940.

STRAUCH, M. A.; AYAZIFAR, M. Bent DNA is found in some but not all, regions recognized by the *Bacillus subtilis* AbrB protein. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 246, p. 756-760, 1995.

STRÖSSER, J.; LÜDKE, A.; SCHAFFER, S.; KRÄMER, R.; BURKOVSKI, A. Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 54, p. 132-147, 2004.

SUTHERLAND, I. W. Biofilm matrix polymers role in adhesion. *In*: NEWMAN, H.N. and WILSON, M. (Ed.). **Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease**. Bioline, Cardiff, 1999. p. 49-62.

TAO, L.; TANZER, J. M.; MACALISTER, T. J. Bicarbonate and potassium regulation of the shape of *Streptococcus mutans* NCTC 10449S. **J. Bacteriol.**, Washington, v.169, p. 2543-2547, 1987.

TAO, L.; MACALISTER, T. J.; TANZER, J. M. Factors influencing cell shape in the mutans group of streptococci. **J. Bacteriol.**, Washington, v.170, p. 3752-3755, 1988.
TERLECKYJ, B.; SHOCKMAN, G. D. Amino acid requirements of *Streptococcus mutans* and other oral streptococci. **Infect. Immun.**, Washington, v. 11 (4), p. 656-664, 1975.

THEUNS, H. M.; van DIJK, J. W.; DRIESSENS, F. C.; GROENEVELD, A. Effect of the pH of buffer solutions on artificial carious lesion formation in human tooth enamel. **Caries Res.**, Basel, v. 18, p. 7-11, 1984.

THOMAS, G.; COUTTS, G.; MERRICK, M. The *glnKamtB* operon: a conserved gene pair in prokaryotes. **Trends. Genet.**, Limerick, v. 16, p. 11-14, 2000.

TIAN, Z.-X.; LI, Q.-S.; BUCK, M.; KOLB, A.; WANG, Y.-P. The CRP-cAMP complex and downregulation of the *glnAp2* promoter provides a novel regulatory linkage between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 41, p. 911-924, 2001.

TODD, E.W., HEWITT, L.F. A new culture medium for the production of antigenic streptococcal haemolysin. **J. Pathol. Bacteriol.**, Nova York, v. 35, p.973, 1932.

TOUKANDARIAN, A.; SAUNDERS, G.; SELMAN-SOSA, G.; SANTERO, E.; WOODLEY, P.; KENNEDY, C. Molecular analysis of the *Azotobacter vinelandii* *glnA* gene encoding glutamine synthetase. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 172, p. 6529-6539, 1990.

TSINOREMAS, N. F.; CASTETS, A. M.; HARRISON, M. A.; ALLEN, J. F.; TANDEAU de MARSAC, N. Photosynthetic electron transport controls nitrogen assimilation in cyanobacteria by means of post-translational modification of the *glnB* gene product. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 88, p. 4565-4569, 1991.

van DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J.; de ZAMAROCZY, M. The *Azospirillum brasilense amtB* gene is responsible for nitrogen regulated ammonium uptake. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W. (Ed.). **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Kluwer Academic: Dordrecht, 1998. p. 127-128.

VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J. Cloning and characterisation of the *Azospirillum brasilense glnD* gene and analysis of a *glnD* mutant. **Mol Genet Genomics**, San Diego, v. 266, n. 5, p. 813-820, Jan 2002.

van HEESWIJK, W. C.; HOVING, S.; MOLENAAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 21, p. 133-146, 1996.

van HOUTE, J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. **Int. Dent. J.**, Guildford, v. 30, n. 4, p. 305-326, 1980.

VEGA-PALAS, M. A.; FLORES, E.; HERRERO, A. NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 6, p. 1853-1859, 1992.

WACKER, L.; LUDWIG, H.; REIF, I.; BLENCKE, H. M.; DETSCH, C.; STULKE, J. The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis* regulation of the *gltAB* operon by catabolite control protein CcpA. **Microbiology**, Reading, v. 149, p. 3001-3009, 2003.

WASSEM, R.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at a enhancer-dependent *nifA* promoter. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 35, p. 756-764, 2000.

WEISS, V.; MAGASANIK, B. Phosphorylation of nitrogen regulator I (NRI) of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 85, p. 8919-8923, 1988.

WEN, Z. T.; BURNE, R. A. Functional genomics approach approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. **Appl Environ Microbiol.** Nova York, v. 68 (3), p. 1196-1203, 2002.

WHILEY, R. A.; BEIGHTON, D. Current classification of the oral streptococci. **Oral Microbiol Immunol.**, Copenhagen, v. 13 (4) p. 195-216, 1998.

WHITE, G.E.; COONEY, C. L.; SINSKEY, A. J.; MILLER, S. A. Continuous culture studies on the growth and physiology of *Streptococcus mutans*. **J. Dent. Res.**, Bethesda, v. 55, p. 239-243, 1976.

WHITTAKER, C. J.; KIER, C. M.; KOLENBRANDER, P. E. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 50, p. 513-552, 1996.

WOEHLE, D. L.; LUEDDECKE, B. A.; LUDDEN, P. W. ATP-dependent and NAD-dependent modification of glutamine synthetase from *Rhodospirillum rubrum* in vitro. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, p. 13741-13749, 1990.

WOOTTON, J.C. Reassessment of ammonium ion affinities of NADP-specific glutamate dehydrogenases: Activation of the *Neurospora crassa* enzyme by ammonium and rubidium ions. **Biochem. J.**, London, v. 209, p. 527-531, 1983.

WOOTTON, J.C.; Mc PHERSON, M. J. Genes of nitrate and ammonium assimilation. **Ann. Proc. Phytochem. Soc. Europe**, v. 23, p. 89-114, 1984.

WOOTTON, J. C.; DRUMMOND, M. The Q-liker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. **Protein Eng.**, Oxford, v.2, p. 535-543, 1989.

WRAY, L. V.; Jr, ATKINSON, M. R.; FISHER, S. H. Identification and cloning of the *glnR* locus, which is required for transcription of the *glnA* gene in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **J. Bacteriol.**, Washington, v. 173, p. 7351-7360, 1991.

WRAY, L. V.; Jr, ATKINSON, M. R.; FISHER, S. H. The nitrogen-regulated *Bacillus subtilis* *nrgAB* operon encodes a membrane protein and a protein highly similar to the *Escherichia coli* *glnB*-encoded P_{II} protein. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 176, p. 108-114, 1994.

WRAY, L. V.; Jr, FERSON, A. E.; ROHRER, K.; FISHER, S. H.; TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 93, p. 8841-8845, 1996.

WRAY, L. V.; FERSON, A. E. Jr.; FISHER, S. H. Expression of the *Bacillus subtilis* *ureABC* operon is controlled by multiple regulatory factors including CodY, GlnR, TnrA and Spo0H. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 179, p. 5494-5501, 1997.

WRAY, L. V.; FISHER, S. A feedback-resistant mutant of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase with pleiotropic defects in nitrogen-regulated gene expression. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 280(39), p. 33298-33304, 2005.

XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, VAN HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S. G.; OLLIS, D. L. GlnK, a P_{II} – homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loops may be involved in molecular recognition. **J. Mol. Biol.**, London, v. 282, p. 149-165, 1998.

XU, Y.; CARR, P.D.; HUBER, T.; VASUDEVAN, S. G.; OLLIS, D. L. The structure of the P_{II}-ATP complex. **Eur. J. Biochem.**, Paris, v. 268, p. 2028-2037, 2001.

XU, Y.; CARR, P. D.; CALNCY, P.; GARCIA-DOMINGUEZ, M.; FORCHHAMMER, K.; FLORENCIO, F.; VASUDEVAN, S. G.; TANDEAU de MARSAC, N.; OLLI, D. L. The structures of the PII proteins from the cyanobacteria *Synechococcus* sp

PCC7942 and *Synechocystis* sp. PCC6803. **Acta Crystallogr. sect. D Biol. Crystallogr.**, Copenhagen, v. 12, p. 2183-2190, 2003.

YAMADA, T.; CARLSSON, J. Phosphoenolpyruvate carboxylase and ammonium metabolism by oral streptococci. **Arch. Oral Biol.**, Amsterdam, v. 18, p. 799-812, 1973.

YAMASHITA, M. M.; ALMASSY, R. J.; JANSON, C. A.; CASCIO, D.; EISENBERG, D. Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 264 (30), p. 17681-17690, 1989.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; ROBERTS, G. P. Cloning, sequencing, mutagenesis, and functional characterization of *draT* and *draG* genes from *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 174, p. 3364-3369, 1992.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Posttranslational regulation of nitrogenase activity by anaerobiosis and ammonium in *Azospirillum brasilense*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 175, p. 6781-6788, 1993.

ZHANG, Y.; CUMMINGS, A. D.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Effect of an *ntrBC* mutation on the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 177, p. 5322-5326, 1995.

ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 152, p. 195-204, 1997.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Functional characterization of three GlnB homologs in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: roles in sensing ammonium and energy status. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 183, p. 6159-6168, 2001.

ZHENG, L.; KOSTREWA, D.; BERNECHE, S.; WINKLER, F. K.; LI, X. D. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 101, p. 17090-17095, 2004.

ZHOU, M. Y.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E.; Universal TA cloning. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 2 (1), p. 1-7, 2000.